



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
Escola Nacional de Saúde Pública

NANOMATERIAIS MANUFATURADOS: AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA ATRAVÉS DA CARACTERIZAÇÃO DOS SEUS EFEITOS GENÉTICOS

Maria Henriqueta Dias Lourenço Garcia Louro

**Tese de Doutoramento em Saúde Pública
na especialidade de Saúde Ambiental e Ocupacional**

Lisboa

2013

Maria Henriqueta Dias Lourenço Garcia Louro

**Nanomateriais manufacturados:
avaliação de segurança através da
caracterização dos seus efeitos genéticos**

Orientação:

Professora Doutora Ema Leite

Professora Convidada

Escola Nacional de Saúde Publica da Universidade Nova de Lisboa

Doutora Maria João Silva

Investigadora Auxiliar

Departamento de Genética Humana

Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

Comissão tutorial:

Professora Doutora Ema Leite

Doutora Maria João Silva

Professora Doutora Carla Nunes

Lisboa

2013

Tese de candidatura ao grau de Doutor em Saúde Pública na Especialidade de Saúde Ambiental e Ocupacional pela Escola Nacional de Saúde Pública da Universidade Nova de Lisboa.

PALAVRAS DE APEÇO

Desde o momento que me propus encarar este desafio, pessoal e profissional, encontrei todo o apoio na Doutora Maria João Silva, que, mais do que orientadora, foi sempre uma amiga que me acompanhou nesta aventura, guiando o meu trabalho com sabedoria, exigência e objetivos de excelência. Para a Maria João, o meu sincero agradecimento.

Não posso deixar de agradecer à Doutora Maria Guida Boavida, fundadora do Departamento de Genética Humana, com quem iniciei o meu percurso na investigação em toxicologia genética, pelo seu ensino e testemunho de vida, que me mostrou como procurar com tenacidade a resposta às questões científicas, sem recear obstáculos ou as dificuldades que muitas vezes surgem em contextos de recursos limitados.

À Dr.^a Glória Isidro, Coordenadora do Departamento de Genética Humana, pela sua amizade e apoio, ao Dr. João Lavinha, pela sua visão inspiradora da ciência, que foi transmitindo ao longo do meu percurso sob a sua supervisão e também pela sua revisão crítica deste trabalho, e ainda a todos os colegas do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), que me acolheram desde há 17 anos, contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional, o meu obrigada.

Um agradecimento especial às minhas colegas do laboratório, Ana Tavares, Nádía Vital e Susana Antunes, pelo seu grande empenho ao meu lado neste projeto, pelas suas contribuições para este trabalho e também por toda a sua amizade e solidariedade. Ao Miguel Pinto, sempre prestável, pela sua ajuda com o ensaio do cometa e por todo o apoio, o meu obrigado. O meu agradecimento ainda à Elsa Alverca e ao Pedro Costa pela sua contribuição com o seu excelente trabalho de microscopia para esta tese.

O meu sincero agradecimento à Professora Doutora Ema Leite, pela sua dedicada orientação, os seus conselhos valiosos, bem como pela cuidada revisão e discussões frutuosas para a construção desta dissertação.

À Professora Doutora Carla Nunes, agradeço o seu acompanhamento, em especial nas minhas dificuldades com a estatística, e as suas sugestões pertinentes no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao Professor Doutor João Prista, pela sua orientação inicial na área da Saúde Ocupacional, e à Escola Nacional de Saúde Pública, pela excelente aprendizagem que me proporcionou em Saúde Pública e também por ter acolhido desde cedo o meu projeto de investigação.

Este trabalho não teria sido possível sem o apoio da Ação Concertada Europeia NANOGENOTOX e o apoio do INSA, que aqui agradeço, bem como a ancoragem científica nos parceiros internacionais desta ação concertada, que, com a sua simpatia e perícia técnica, permitiram uma abordagem multidisciplinar fundamental à nanotoxicologia. A todos os colegas do NANOGENOTOX, um grande obrigado.

A todos os que contribuíram, direta ou indiretamente com o seu apoio para este estudo, o meu sincero agradecimento.

Aos meus Pais, a minha gratidão pelo seu forte incentivo e pelo carinho e apoio familiar constante. Pelos seus exemplos de vida, que me ensinaram que vale a pena procurar superar os nossos objetivos e sonhos, o meu obrigado. Às minhas irmãs, obrigada pelo encorajamento em todo este percurso e pela boa vontade para ajudar em todos os momentos.

Ao meu marido, pelo seu apoio incondicional e por todo o esforço que este percurso implicou para toda a família, o meu apreço!

Por fim, gostaria de dedicar este estudo aos meus filhos, António e Manuel, a “geração futura”, por quem vale a pena investigar como construir um futuro repleto das maravilhas da inovação tecnológica, mas assegurando a proteção do ambiente e da saúde humana.

ÍNDICE

Lista de tabelas.....	x
Lista de figuras	xii
Lista de abreviaturas e siglas.....	xv
RESUMO	xix
ABSTRACT	xxiii
CAPÍTULO I. ENQUADRAMENTO TEÓRICO	1
1. Os Nanomateriais	1
1.1. Propriedades dos Nanomateriais Manufaturados	3
1.2. Aplicações dos Nanomateriais Manufaturados: as Nanotecnologias	5
1.3. A produção e desenvolvimento de Nanomateriais em Portugal	7
2. Exposição humana a Nanomateriais Manufaturados	10
2.1. Exposição ambiental.....	12
2.2. Exposição ocupacional	14
2.3. Vias de exposição humana e toxicocinética	16
3. Análise de risco e segurança dos Nanomateriais Manufaturados	19
4. Curvas dose-resposta em análise de risco.....	26
5. Toxicidade dos Nanomateriais: a Nanotoxicologia	30
6. Potenciais efeitos adversos dos Nanomateriais Manufaturados.....	35
6.1. Efeitos na saúde humana	35
6.2. Possíveis mecanismos para os efeitos carcinogénicos dos nanomateriais	37
6.3. Ensaio de genotoxicidade e sua aplicação aos nanomateriais	40
6.4. Nanomateriais de dióxido de titânio.....	51
6.5. Nanotubos de carbono	64
6.6. Nanomateriais de óxido de zinco	73
CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS GENÉTICOS DOS NANOMATERIAIS MANUFATURADOS	77
1. Introdução.....	77
2. Objectivos	79
3. Questões de investigação	80
4. Desenho do estudo.....	81
5. Amostra do estudo e definição de variáveis	83
6. Metodologias	86

6.1.	Nanomateriais manufaturados analisados	86
6.2.	Caracterização de genotoxicidade dos NMs <i>in vitro</i>	89
6.2.1.	Linhas celulares e sua exposição aos nanomaterais	89
6.2.2.	Ensaio de citotoxicidade em linhas celulares	91
6.2.3.	O ensaio do micronúcleo <i>in vitro</i>	93
6.2.4.	O ensaio do cometa <i>in vitro</i>	95
6.3.	Determinação de lesões oxidativas induzidas pelos NMs <i>in vitro</i>	97
6.4.	Caracterização de genotoxicidade dos NMs <i>in vivo</i>	98
6.4.1.	Exposição dos Ratinhos LacZ	98
6.4.2.	O ensaio do micronúcleo em sangue periférico de ratinho.....	100
6.4.3.	O ensaio do cometa em órgãos de ratinho	101
6.4.4.	Ensaio de mutações no ratinho transgênico LacZ	101
6.6.	Análise de dados e estatística	104
6.7.	Questões éticas	106
7.	Resultados.....	108
7.1.	Caracterização da cito e genotoxicidade dos nanomateriais <i>in vitro</i>	108
7.1.1.	Linfócitos humanos.....	109
7.1.2.	Células BEAS-2B	113
7.1.3.	Células A549	120
7.1.4.	Efeitos do óxido de zinco em células humanas.....	127
7.1.5.	Análise comparativa dos efeitos do dióxido de titânio em células humanas.....	130
7.1.6.	Análise comparativa dos efeitos dos nanotubos de carbono em células humanas	132
7.2.	Determinação de lesões oxidativas induzidas pelos NMs <i>in vitro</i>	134
7.3.	Caracterização da genotoxicidade de nanomateriais <i>in vivo</i>	138
7.3.1.	Ensaio do micronúcleo em sangue periférico.....	138
7.3.2.	Ensaio de cometa em órgãos de ratinhos.....	139
7.3.3.	Mutações no transgene LacZ	139
7.4.	Bioacumulação dos nanomateriais <i>in vivo</i>	141
8.	DISCUSSÃO.....	143
8.1.	Interferência dos Nanomateriais Manufaturados nos ensaios biológicos	143
8.2.	Citotoxicidade dos nanomateriais <i>in vitro</i>	145
8.3.	Genotoxicidade dos nanomateriais <i>in vitro</i>	151
8.3.1.	Nanomateriais de dióxido de titânio	154
8.3.2.	Nanotubos de carbono de parede múltipla	158
8.3.3.	Correlação entre as características dos nanomateriais e a sua genotoxicidade <i>in vitro</i>	160
8.3.4.	Óxido de zinco	163

8.3.5. Lesões oxidativas induzidas pelos NMs <i>in vitro</i>	164
8.3.6. Análise global dos ensaios <i>in vitro</i>	166
8.4. Genotoxicidade dos nanomateriais <i>in vivo</i>	170
8.4.1. Lesões genéticas induzidas pelos NMs <i>in vivo</i>	170
8.4.2. Bioacumulação dos nanomateriais <i>in vivo</i>	175
8.5. Comparação entre os resultados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	175
9. Conclusões e Perspectivas futuras	178
9.1. Necessidades sociais sobre Nanomateriais Manufaturados	178
9.2. Conclusões do presente estudo.....	180
9.3. Perspetivas Futuras- os Nanomateriais no caminho da Saúde Ambiental e Ocupacional.....	184
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	188
APÊNDICES	221
Apêndice I. Tabelas de resultados dos ensaios em Linfócitos	222
Apêndice II. Tabelas de resultados dos ensaios em BEAS-2B	228
Apêndice III. Tabelas de resultados dos ensaios em A549	230
Apêndice IV. Tabelas de resultados dos ensaios em células expostas a óxido de zinco	234
Apêndice V. Tabelas de Resultados do Ensaio do Cometa Modificado com FPG	236
Apêndice VI. Tabelas da Exposição de Ratinhos a NM-102	239

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Alguns exemplos de aplicações de nanomateriais manufacturados, em produtos de utilização correntes e de consumo humano.....	5
Tabela 2.	Nanotecnologia em Portugal.	8
Tabela 3.	Concentração ambiental prevista de NMs no ar, água e solo, na Suíça	12
Tabela 4.	Resumo da Regulamentação Europeia sobre NM.....	20
Tabela 5.	Comparação das características gerais, biocinética e efeitos entre nanopartículas e partículas de dimensões normais.....	30
Tabela 6.	Potenciais efeitos adversos dos NMs e as evidências científicas que os sugerem	35
Tabela 7.	As duas opções de testes adequados para avaliação do potencial mutagénico/ carcinogénico de novos produtos farmacêuticos	42
Tabela 8.	Principais vantagens e desvantagens dos ensaios de mutações com ratinhos transgénicos	46
Tabela 9.	Exemplo de enzimas específicas para determinadas lesões no DNA.....	49
Tabela 10.	Produção mundial e consumo de dióxido de titânio (em milhares de toneladas).....	51
Tabela 11.	Resumo de estudos epidemiológicos na literatura sobre a exposição a TiO ₂	54
Tabela 12.	Resumo dos principais resultados na literatura sobre a genotoxicidade do TiO ₂ <i>in vitro</i> , onde não houve efeitos genotóxicos (negativos).....	56
Tabela 13.	Resumo dos principais resultados na literatura sobre a genotoxicidade do TiO ₂ <i>in vitro</i> , onde se observaram efeitos genotóxicos (positivos).	58
Tabela 14.	Resumo dos principais resultados sobre a genotoxicidade do TiO ₂ <i>in vivo</i> , onde não houve efeitos genotóxicos (negativos).	61
Tabela 15.	Resumo dos principais resultados sobre a genotoxicidade do TiO ₂ <i>in vivo</i> , onde se observaram efeitos genotóxicos (positivos).	62
Tabela 16.	Resumo dos principais resultados na literatura sobre a genotoxicidade do nanotubos de carbono <i>in vitro</i> , onde não se observaram efeitos genotóxicos (negativos).	67
Tabela 17.	Resumo dos principais resultados na literatura sobre a genotoxicidade do nanotubos de carbono <i>in vitro</i> , onde se observaram efeitos genotóxicos (positivos).	68
Tabela 18.	Resumo dos principais resultados na literatura sobre a genotoxicidade do nanotubos de carbono <i>in vivo</i> , onde não se observaram efeitos genotóxicos (negativos).	71
Tabela 19.	Resumo dos principais resultados na literatura sobre a genotoxicidade do nanotubos de carbono <i>in vivo</i> , onde se observaram efeitos genotóxico (positivos).....	71
Tabela 20.	Resumo dos principais resultados na literatura sobre a genotoxicidade do óxido de zinco <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , onde não se observaram efeitos genotóxicos (negativos).....	75
Tabela 21.	Resumo dos principais resultados na literatura sobre a genotoxicidade do óxido de zinco <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , onde se observaram efeitos genotóxicos (positivos).	76
Tabela 22.	Hipóteses de investigação no âmbito desta dissertação.	80
Tabela 23.	Lista de variáveis em estudo.	84

Tabela 24.	Fundamentação do estabelecimento da dimensão da amostra em estudo.	85
Tabela 25.	Características de diâmetro (Feret) e proporções típicas de vários NMs de dióxido de titânio e óxido de zinco.	87
Tabela 26.	Características dos nanotubos de carbono de parede múltipla.	87
Tabela 27.	Descrição dos grupos de exposição no ensaio <i>in vivo</i>	99
Tabela 28.	Resumo dos princípios basilares do Código de Conduta para Investigação responsável em nanociência e nanotecnologia.	106
Tabela 29.	Relação dose-resposta observada relativamente à sobrevivência celular após NTCs.	121
Tabela 30.	Frequência de Mutantes (FM) no fígado e no baço de ratinhos submetidos a duas injeções de 0, 10 ou 15 mg/kg de NM-102 com 24h de intervalo.	140
Tabela 31.	Algumas dificuldades identificadas na execução dos ensaios biológicos utilizando NMs.	144
Tabela 32.	Resumo dos resultados obtidos na avaliação da citotoxicidade dos NMs <i>in vitro</i>	147
Tabela 33.	Resumo dos resultados obtidos na avaliação da genotoxicidade dos NMs <i>in vitro</i>	154
Tabela 34.	Comparação entre as características de cada NM descritas em Tavares <i>et al.</i> , 2013 de acordo com a evidência de genotoxicidade através do ensaio do micronúcleo em linfócitos.	160
Tabela 35.	Comparação entre as características de cada NM e a média da frequência de micronúcleos em linfócitos.	161
Tabela 36.	Comparação dos resultados obtidos nos ensaios de genotoxicidade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> após exposição ao NM-102.	176

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	A escala nano: comparação da dimensão de alguns nanomateriais- os nanotubos de carbono e dendrímeros- com a dimensão das estruturas biológicas.	2
Figura 2.	Ilustração do aumento da área superficial com a diminuição da dimensão das partículas...	3
Figura 3.	O comportamento dinâmico dos nanomateriais.....	4
Figura 4.	Número total de produtos de consumo humano contendo nanomateriais.	6
Figura 5.	Esquema simplificado das fases do ciclo de vida de um nanomaterial manufaturado.....	10
Figura 6.	Possíveis fontes de exposição a NMs, com base nas aplicações actuais e futuras	11
Figura 7.	Previsão da libertação de TiO_2 no ambiente com base na estimativa de produção deste NM nos EUA.	13
Figura 8.	Distribuição mundial de produtores de nanotubos.....	14
Figura 9.	Exemplo de dois cenários de exposição de trabalhadores a NMs ao aplicar tratamentos nos revestimentos de superfícies exteriores.....	15
Figura 10.	Representação esquemática do corpo humano, potenciais vias de exposição a NMs e órgãos afetados.....	18
Figura 11.	Elementos chave na análise de risco dos nanomateriais, sua conexão com a nanotoxicologia e interação com a Saúde Pública	21
Figura 12.	Curva dose-efeito típica, com forma de sigmoide, definida por 4 parâmetros.....	27
Figura 13.	Exemplo de modelos da relação dose-resposta comuns em toxicologia	28
Figura 14.	Exemplo de curvas monotónicas e não monotónicas.....	28
Figura 15.	Representação esquemática do destino biológico dos NMs em meio fisiológico, de acordo com o seu desenho químico.	31
Figura 16.	Mecanismos indirectos que podem conduzir à genotoxicidade pelos NM	37
Figura 17.	A relação complexa entre genotoxicidade e o aparecimento de cancro.	39
Figura 18.	Complexidade que afeta o resultado da exposição a agentes genotóxicos <i>in vivo</i>	41
Figura 19.	Formação de micronúcleos e ponte nucleoplásmica durante a divisão celular e microfotografia de células de adeno carcinoma humano (A549) após bloqueio da citocinese.	43
Figura 20.	O ensaio do micronucleo <i>in vivo</i> em células hematopoiéticas de roedor	44
Figura 21.	O modelo de ratinho transgénico baseado em plasmídeo contendo o gene <i>LacZ</i>	47
Figura 22.	Microfotografias de alguns cometas, apresentando diferentes níveis de lesões no DNA.	48
Figura 23.	Formas cristalinas do dióxido de titânio	52
Figura 24.	Representação esquemática de (A) folha de grafeno; (B) nanotubos de carbono de parede simples; (C) nanotubos de carbono de parede múltipla.	64
Figura 25.	Estrutura cristalina do ZnO, hexagonal, em “wurtzite”	73
Figura 26.	Delineamento experimental do estudo desenvolvido.....	81
Figura 27.	Os nanomateriais selecionados para este trabalho..	86
Figura 28.	Exemplo de dispersão de um NM	88

Figura 29.	Microfotografia das células em cultura.....	90
Figura 30.	Representação esquemática da exposição das células aos NMs e do procedimento do ensaio do micronúcleo.	94
Figura 31.	Representação esquemática da exposição das células aos NMs e do procedimento do ensaio do cometa.	95
Figura 32.	Representação esquemática do procedimento do ensaio do cometa	96
Figura 33.	Representação esquemática da exposição e colheita de amostras no ensaio em ratinhos.	99
Figura 34.	Processo de recuperação do transgene <i>LacZ</i> no modelo de ratinho baseado em plasmídeo.	102
Figura 35.	Exemplo de microfotografias ilustrativas do ensaio do micronúcleo em linfócitos humanos.....	108
Figura 36.	Resultados do ensaio do micronúcleo em linfócitos expostos a TiO ₂	110
Figura 37.	Resultados do ensaio do micronúcleo em linfócitos expostos a NTCs..	112
Figura 38.	Microfotografias ilustrativas do aspeto das células BEAS-2B em cultura.....	114
Figura 39.	Viabilidade celular, determinada pelo ensaio do azul de tripano, após exposição das células BEAS-2B aos NMs.	114
Figura 40.	Microfotografias representativas dos ensaios de genotoxicidade nas células BEAS-2B expostas aos NMs.....	115
Figura 41.	Resultados do ensaio do micronúcleo (A), CBPI (B), índice replicativo (C) e ensaio do cometa (D) em células BEAS-2B expostas a NM-102.....	117
Figura 42.	Resultados do ensaio do micronúcleo (A), CBPI (B), índice replicativo (C) e ensaio do cometa (D) em células BEAS-2B expostas a NM-403.....	119
Figura 43.	Resultados do ensaio clonogénico em células A549 expostas a NM-102.	120
Figura 44.	Resultados do ensaio clonogénico em células A549 expostas a NM-402 e NM-403. ..	121
Figura 45.	Resultados do ensaio do micronúcleo e do cometa em células A549 expostas a NM-102.....	123
Figura 46.	Microfotografia das células A549 expostas à dose mais elevada de NM-102.....	124
Figura 47.	Resultados do ensaio do micronúcleo (A), CBPI (B), RI (C) em ensaio do cometa (D) em células A549 expostas a NTCs.	125
Figura 48.	Resultado do ensaio no ensaio viabilidade celular do azul de tripano, após exposição das células BEAS-2B por 24h a ZnO.	127
Figura 49.	Resultado do ensaio de viabilidade celular do vermelho neutro em células A549 expostas a NM-110.	128
Figura 50.	Resultados do ensaio de micronúcleo e do cometa após exposição de linfócitos humanos, células BEAS-2B e A549 a NM-110.....	129
Figura 51.	Comparação da média da frequência de CBMN, CBPI, RI e DNA na cauda obtida em cada tipo celular exposto a NM-102.....	131

Figura 52.	Comparação da frequência média de CBMN, CBPI, RI ou DNA na cauda obtida em cada tipo celular exposto a NM-403.....	133
Figura 53.	Resultados do ensaio do cometa modificado com FPG, obtidos em células BEAS-2B expostas 24h a cada NM.....	135
Figura 54.	Resultados do ensaio do cometa modificado com FPG, em células A549 expostas a (A) NM-102; (B) NM-402 ou NM-403; (C) NM-110 e controlos positivos, relativamente a 3h ou 24h de exposição.	136
Figura 55.	Resultados da análise de micronúcleos em eritrócitos de ratinho expostos a NM-102, 42h após a última injeção.....	138
Figura 56.	Resultados do ensaio do cometa em células do fígado e baço de ratinhos expostos a NM-102, 28 dias após a última injeção.	139
Figura 57.	Secções histológicas do fígado dos ratinhos do presente estudo (H&E).	141
Figura 58.	Microfotografias de células do fígado de ratinhos expostos a 10 mg/kg (A) ou 15 mg/kg de NM-102 (B, C)..	142
Figura 59.	Relação entre a citotoxicidade e a genotoxicidade determinados através do ensaio do micronúcleo em células BEAS-2B expostas a 0- 256 µg/ml de NM-102.	156
Figura 60.	Representação gráfica da correlação entre o diâmetro do TiO ₂ e a frequência de micronúcleos em linfócitos humanos.	162
Figura 61.	Comparação do resultado do ensaio do micronúcleo utilizado uma métrica baseada na massa (µg/ml) ou na área superficial de cada NM (cm ² /ml).	168
Figura 62.	Enquadramento da nanotoxicologia nas necessidades “societais” atuais para garantia da saúde pública.	178

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A549	Células de adenocarcinoma epitelial de pulmão humano
b.w.	<i>Body weight</i> ou peso corporal
BEAS-2B	Células imortalizadas de epitélio brônquico humano
CBMN	Células binucleadas micronucleadas
CBPI	<i>Cytokinesis-blocked proliferation index</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
DLS	<i>dynamic light scattering</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico ou ADN
EAHC	<i>Executive Agency for Health and Consumers</i>
EC₅₀	Concentração necessária para um obter efeito de 50%
ECHA	Agência Europeia dos Químicos
EMA	European Medicines Agency
EMS	Etil-metanosulfonato
ENU	Etil-nitrosureia
EUA	Estados Unidos da América
EU-OSHA	<i>European Agency for Safety and Health at Work</i>
FDA	Food and Drug Administration
FPG	Formamido-aminopirimidina glicosilase
FPG	enzima formamido-aminopirimidinaglicosilase
GLP	<i>Good laboratory practice</i> ou boas práticas laboratoriais
I&D	Investigação e Desenvolvimento
i.p.	Injeção intra-peritoneal
i.v.	Injeção intra-venosa
IARC	<i>International Agency For Research on Cancer</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
ICRP	<i>International Commission on Radiation Protection</i>
INRS	Instituto Francês de Investigação e Segurança
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
IPCS	<i>International Programme on Chemical Safety</i>
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
JRC	<i>Joint Research Center</i>
LacZ	Gene da β -galactosidase de <i>E.coli</i>
LOAEL	<i>Lowest observed adverse effect level</i> , ou nível de dose mais baixa em que se verifica ocorrência de efeito adverso
LOEL	<i>Lowest observed effect level</i> ou nível de dose mais baixa em que se verifica ocorrência de efeito

LOEL	<i>Lowest observed effect level</i> , ou nível de dose mais baixa em que se verifica ocorrência de efeito
MMC	Mitomicina C
MWCNT	<i>Multi-walled carbon nanotube</i> ou nanotubos de carbono de parede múltipla
NIOSH	<i>National Institute for Occupational Safety and Health</i>
NM	Nanomaterial manufaturado
nm	Nanómetro
NOAEL	<i>No Observed Adverse Effect Level</i> ou a maior dose em que não se verifica qualquer efeito adverso
NOEL	<i>No Observed Adverse Effect Level</i>
NRCWE	<i>National Research Centre for the Working and Environment</i>
NTC	Nanotubo de carbono
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OSHA	<i>Occupational Safety and Health Administration</i>
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals
RETs	Eritrócitos imaturos ou reticulócitos
RI	<i>Replication index</i>
RIPoN	<i>REACH Implementation Project on Nanomaterials</i>
RIVM	Instituto Holandês para a Saúde Pública e Ambiente
ROS	Espécies reativas de oxigénio
SCCS	<i>Scientific Committee on Consumer Safety</i>
SCE	<i>Sister chromatid exchange</i> ou trocas de cromátídeos irmãos
SCENIHR	<i>Scientific Committee on emerging and Newly Identified Health Risks</i>
SWCNT	<i>Single-walled carbon nanotube</i> ou nanotubo de carbono de parede simples
TEM	Microscopia electrónica de transmissão
TiO₂	Dióxido de titânio
UE	União Europeia
UV	Ultra-violeta
ZnO	Óxido de zinco

*“As we go down in size,
there are a number of interesting problems that arise.*

All things do not simply scale down in proportion.”

Richard Feynman, 1960

RESUMO

Os nanomateriais manufaturados (NMs), isto é, fabricados deliberadamente para fins específicos, apresentam propriedades físico-químicas únicas como a dimensão, área superficial ou funcionalização, que lhes conferem características mecânicas, óticas, elétricas e magnéticas muito vantajosas para aplicações industriais e biomédicas. Efetivamente, a tecnologia baseada nos NMs, ou nanotecnologia, foi identificada como uma *key enabling technology*, impulsionadora do crescimento económico dos países industrializados, devido ao seu potencial para melhorar a qualidade e desempenho de muitos tipos de produtos e de processos. Contudo, a expansão da utilização de NMs contrasta com a insuficiente avaliação de risco para a saúde humana e para o ambiente, sendo considerados como um risco emergente para a saúde pública. As incertezas sobre a segurança dos NMs para a saúde pública advêm sobretudo de estudos epidemiológicos em humanos expostos a nanomateriais produzidos como consequência dos processos e atividades humanas e da poluição. Uma das principais preocupações relativamente aos efeitos adversos dos NMs na saúde humana é o seu potencial efeito carcinogénico, que é sugerido por alguns estudos experimentais, como no caso dos nanomateriais de dióxido de titânio ou dos nanotubos de carbono. Para avaliar em curto termo as propriedades carcinogénicas de um composto, utilizam-se frequentemente ensaios de genotoxicidade em linhas celulares de mamífero ou ensaios em modelos animais, em que se analisa uma variedade de lesões genéticas potencialmente relacionados com o processo de carcinogénese. No entanto, a investigação sobre as propriedades genotóxicas dos NMs não foi, até hoje, conclusiva.

O presente estudo tem por objectivo principal caracterizar os efeitos genotóxicos associados à exposição a nanomateriais manufaturados, de forma a contribuir para a avaliação da sua segurança. Constituíram objectivos específicos deste estudo: i) avaliar a genotoxicidade dos NMs em três tipos de células humanas expostas *in vitro*: linfócitos humanos primários, linha celular de epitélio brônquico humano (BEAS-2B) e linha celular de adenocarcinoma epitelial de pulmão humano (A549); ii) avaliar a sua genotoxicidade num modelo de ratinho transgénico; iii) investigar alguns mecanismos de acção que poderão contribuir para a genotoxicidade dos nanomateriais, como a contribuição de lesões oxidativas para a genotoxicidade induzida pelos NMs *in vitro*, e a investigação da sua bioacumulação e localização celular *in vivo*.

Foram analisados os efeitos genotóxicos associados à exposição a duas classes de NMs, dióxido de titânio e nanotubos de carbono de parede múltipla, bem como a um NM de óxido de zinco, candidato a ser utilizado como controlo positivo de dimensão nanométrica. Os

NMs utilizados foram previamente caracterizados com detalhe relativamente às suas características físico-químicas e também relativamente à sua dispersão em meio aquoso e no meio de cultura. A metodologia incluiu ensaios de citotoxicidade e de genotoxicidade *in vitro*, designadamente, ensaios de quebras no DNA (ensaio do cometa) e nos cromossomas (ensaio do micronúcleo) em células humanas expostas a várias concentrações de NMs, por comparação com células não expostas. Também foram realizados ensaios *in vivo* de quebras no DNA, quebras cromossómicas e ainda um ensaio de mutações em vários órgãos de grupos de ratinhos transgênicos *LacZ*, expostos por via intravenosa a duas doses de dióxido de titânio. Foi investigada a existência de uma relação dose-resposta após exposição das células humanas ou dos animais a NMs. A contribuição de lesões oxidativas para a genotoxicidade após exposição das células aos NMs *in vitro* foi explorada através do ensaio do cometa modificado com enzima. Realizaram-se estudos histológicos e citológicos para deteção e localização celular dos NMs nos órgãos-alvo dos ratinhos expostos *in vivo*.

Os resultados demonstraram efeitos genotóxicos em alguns dos NMs analisados em células humanas. No entanto, os efeitos genotóxicos, quando positivos, foram em níveis reduzidos, ainda que superiores aos valores dos controlos, e a sua reprodutibilidade era dependente do sistema experimental utilizado. Para outros NMs, a evidência de genotoxicidade revelou-se equívoca, conduzindo à necessidade de esclarecimento através de ensaios *in vivo*. Para esse fim, recorreu-se a uma análise integrada de múltiplos parâmetros num modelo animal, o ratinho transgênico baseado em plasmídeo contendo o gene *LacZ* exposto a um NM de dióxido de titânio, NM-102. Embora tenha sido demonstrada a exposição e a acumulação do NM no fígado, não se observaram efeitos genotóxicos nem no fígado, nem no baço nem no sangue dos ratinhos expostos a esse NM.

Neste estudo concluiu-se que algumas formas de dióxido de titânio e nanotubos de carbono de parede múltipla produzem efeitos genotóxicos em células humanas, contribuindo para o conjunto de evidências sobre o efeito genotóxico desses NMs. As diferenças observadas relativamente à genotoxicidade entre NMs do mesmo tipo, mas distintos em algumas das suas características físico-químicas, aparentemente não são negligenciáveis, pelo que os resultados obtidos para um NM não devem ser generalizados ao grupo correspondente. Para além disso, a genotoxicidade equívoca verificada para o NM-102 em células humanas expostas *in vitro*, não foi confirmada no modelo *in vivo*, pelo que o valor preditivo da utilização dos ensaios *in vitro* para a identificação de NMs com efeitos genotóxicos (e portanto potencialmente carcinogénicos) ainda tem de ser esclarecido antes de ser possível extrapolar as conclusões para a saúde humana. Por sua vez, como a informação aqui produzida pelas metodologias *in vitro* e *in vivo* não reflete os efeitos de exposição contínua ou prolongada, que poderá conduzir a efeitos genotóxicos distintos, esta

deverá ser complementada com outras linhas de evidência relativamente à segurança dos NMs. Perante a incerteza dos níveis de exposição real do organismo humano e do ambiente, a segurança da utilização dos NMs não pode ser garantida a longo prazo e, tendo em conta a elevada produção e utilização destes NMs, são prementes futuros estudos de monitorização ambiental e humana.

PALAVRAS-CHAVE: Nanomateriais Manufaturados; Saúde Pública; Genotoxicidade; Citotoxicidade; Dióxido de titânio; Nanotubos de carbono de parede múltipla

ABSTRACT

The manufactured nanomaterials (NMs) have specific physicochemical properties that confer unique mechanical, optical, electrical and magnetic characteristics that are beneficial for biomedical and industrial applications. However, the exponential developments of nanotechnologies contrast with the still insufficient risk assessment for human health and the environment, leading to uncertainties in terms of public health. The concerns about the potential risks of NMs for public health arise mainly from epidemiologic studies in humans exposed to nanomaterials generated as by-products from human activity and pollution. One of the major concerns about NMs is the potential to induce cancer, suggested by some experimental studies, as seen for titanium dioxide or carbon nanotubes. To analyse in a short term the carcinogenic properties of a compound, genotoxicity assays in mammalian cell lines or animal models are frequently used. However, the investigation of the genotoxic properties of NMs has been inconclusive, up to date.

The present work aimed at evaluating the genotoxic effects associated with the exposure to NMs, in order to contribute to the identification of adverse effects and safety evaluation of the NMs. The specific objectives were to: i) evaluate the *in vitro* genotoxicity of NMs using three cell types: human lymphocytes, human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) and adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells (A549); ii) evaluate the genotoxicity in a transgenic mouse model exposed *in vivo*; iii) investigate some of the mechanisms of action that may underlie NMs genotoxicity *in vitro*, such as oxidative lesions, and analyse the NMs' bioaccumulation and cellular localization in mouse tissue.

Two classes of NMs were analysed in the presente study, namely, titanium dioxide nanomaterials and multiwalled carbon nanotubes, as well as a zinc oxide nanomaterial as a potential candidate to be used as nanosized positive control. The morphology and size of those NMs were previously characterized, as well as their dispersion in aqueous medium and cell culture medium. The methodology included citotoxicity and genotoxicity assays *in vitro* and *in vivo*, namely, assays for detection of DNA strand breaks and chromosome breakage/loss in human and mouse cells exposed to NMs that have been characterized in respect to their physic-chemical properties. An assay for gene mutations in a *LacZ*-based transgenic mouse model was also performed.

The results show the genotoxic effects of some of the NMs analysed, in human cells. However, even with those forms of NMs that were positive in our study, the observed genotoxicity was low, though higher than the negative control values, and their reproducibility was dependent on the experimental system that was used. For some NMs, the equivocal

genotoxic effects observed *in vitro* prompted further investigation using *in vivo* assays. The *LacZ*-based transgenic mouse model was used in an integrated approach in which several endpoints were analysed following exposure to a titanium dioxide nanomaterial, NM-102. Although the bioaccumulation of the NM in liver was demonstrated, no genotoxic effects were observed in liver, spleen or blood (thus bone marrow) from mice exposed to two doses of NM-102.

In conclusion, the findings described in this study show that some forms of titanium dioxide and multiwalled carbon nanotubes yield genotoxic effects in human cells, increasing the weight of evidence towards a genotoxic effect of some of the forms of titanium dioxide and multiwalled carbon nanotubes analysed in human cells *in vitro*. Regarding safety assessment, the different genotoxicity observed in closely related NMs, but that differs in some physico-chemical characteristics, highlights the importance of investigating the toxic potential of each NM individually, instead of assuming a common mechanism and equal genotoxic effects for a set of similar NMs.

Furthermore, the equivocal genotoxicity of NM-102 in human cells *in vitro* was not confirmed *in vivo*, and therefore the predictive value of these *in vitro* tests for identifying genotoxic (and potentially carcinogenic) NMs *in vivo* should be clarified before extrapolating the conclusions for human health. Furthermore, the data hereby presented using *in vitro* and *in vivo* approaches does not reflect continuous exposure and data on prolonged exposure and accumulation of NMs *in vivo* may lead to different genotoxic consequences. Thus, it should be complemented with other lines of evidence related to the levels and duration of individual's exposure, both in environment and occupational settings.

KEYWORDS: Manufactured Nanomaterials; Public Health; Genotoxicity; Cytotoxicity; Titanium dioxide; Multiwalled carbon nanotubes

Na presente dissertação incluem-se textos dos seguintes trabalhos publicados, ou em fase de submissão para publicação:

Henriqueta Louro, Ana Tavares, Ema Leite, Maria João Silva. **Nanotecnologias e saúde pública**. TecnoHospital. (Set/Out 2013) 12-16.

Henriqueta Louro, Ana Tavares, Nádia Vital, Pedro M. Costa, Elsa Alverca, Edwin Zwart, Wim H. de Jong, Valérie Fessard, João Lavinha, Maria J. Silva. **Integrated approach to the *in vivo* genotoxic effects of a titanium dioxide nanomaterial using *LacZ* plasmid-based transgenic mice**. Environmental and Molecular Mutagenesis. 2013. *Em revisão*.

Henriqueta Louro, Teresa Borges, Maria João Silva. **Nanomateriais manufacturados – Novos desafios para a saúde pública**. Revista Portuguesa de Saúde Pública. 2013; 31:145-57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rpsp.2012.12.004>.

Henriqueta Louro, Ana Tavares, Susana Antunes, Nádia Vital, João Lavinha, Maria João Silva. **Caracterização da genotoxicidade de nanomateriais manufacturados e potencial impacto na saúde humana**. Observações- Boletim epidemiológico. 2: 4 (Abril-Junho 2013) 23-24. ISSN: 2182-8873 (em linha), Ed. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP. (disponível em www.insa.pt).

Ana Tavares, Henriqueta Louro, Susana Antunes, Stephanie Quarré, Sophie Simar, Pieter-Jan De Temmerman, Eveline Verleysen, Jan Mast, Keld A. Jensen, Hannu Norppa, Fabrice Nessler, Maria João Silva. **Genotoxicity evaluation of nanosized titanium dioxide, synthetic amorphous silica and multi-walled carbon nanotubes in human lymphocytes**. Toxicology *In vitro*. 2013. *In press*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2013.06.009>.

CAPÍTULO I. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

1. OS NANOMATERIAIS

As partículas exógenas de dimensões da ordem dos nanómetros são designadas como nanomateriais. O prefixo ‘nano-’, com origem na palavra grega *νᾶνος* (anão), significa uma medida de 10^{-9} unidades, sendo um nanómetro correspondente a 10^{-9} metros. Contudo, a procura de uma definição para “nanomaterial” tem gerado alguma polémica: existem várias definições para os nanomateriais formuladas por entidades internacionais (como a FDA, Health Canada, ISO, OECD; revistas em SCENIHR, 2010). Numa tentativa de obviar essas inconsistências, a Comissão Europeia emitiu em 2011 uma recomendação (Comissão Europeia, 2011) sobre a definição de nanomaterial, que se transcreve:

“Por «nanomaterial», entende-se um material natural, incidental ou fabricado, que contém partículas num estado desagregado ou na forma de um agregado ou de um aglomerado, e em cuja distribuição número-tamanho 50 % ou mais das partículas têm uma ou mais dimensões externas na gama de tamanhos compreendidos entre 1 e 100 nanómetros. Em casos específicos e sempre que tal se justifique devido a preocupações ambientais e ligadas à saúde, segurança e competitividade, o limiar da distribuição número-tamanho de 50% pode ser substituído por um limiar compreendido entre 1 e 50%.”

Subsequentemente, no mesmo documento, a Comissão Europeia define:

“a) «Partícula», uma porção minúscula de matéria com fronteiras físicas definidas;

b) «Aglomerado», um conjunto de partículas levemente agregadas ou de agregados em que a superfície externa é igual à soma das superfícies dos componentes específicos;

c) «Agregado», uma partícula composta por partículas fortemente ligadas ou aglutinadas.”

A dimensão “nano”, em comparação com várias estruturas químicas e biológicas, é ilustrada na Figura 1.

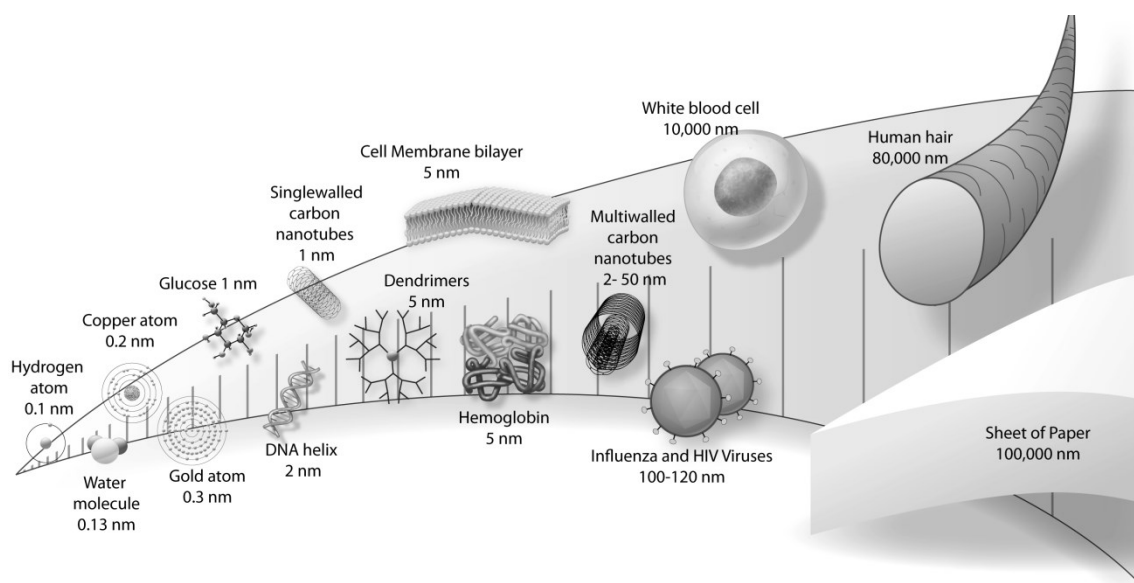


Figura 1. A escala nano: comparação da dimensão de alguns nanomateriais- os nanotubos de carbono e dendrímeros- com a dimensão das estruturas biológicas (Yokel; MacPhail, 2011).

Assim, a dimensão dos NMs é semelhante à de muitos dos componentes celulares, sendo provável a sua interacção durante os processos bioquímicos (Yokel; MacPhail, 2011).

Relativamente à sua origem, os nanomateriais podem classificar-se como naturais, antropogénicos ou ainda como manufacturados (Buzea; Pacheco; Robbie, 2007). O primeiro grupo engloba por exemplo, nanomateriais produzidos e libertados nas emissões vulcânicas, nos fogos florestais, frequentemente designados por partículas ultrafinas, e ainda alguns vírus. Os nanomateriais de origem antropogénica são aqueles produzidos no decurso da actividade humana, tais como nos processos de refinação, soldadura, confeção de alimentos ou combustão automóvel (Buzea; Pacheco; Robbie, 2007). Quando sintetizados deliberadamente para um fim específico, os nanomateriais dizem-se manufacturados, como é o caso de diversos nanomateriais de dióxido de titânio, nanotubos de carbono ou sílica sintética amorfa.

Existe uma grande diversidade de nanomateriais manufacturados (NMs), que variam na sua composição química e forma, dificultando a compreensão das suas propriedades. Para além disso, alguns nanomateriais contêm contaminantes, como catalisadores metálicos residuais utilizados na sua síntese, que poderão causar toxicidade.

Os NMs incluídos nos produtos de consumo humano podem ser classificados em lábeis, quando se desintegram nos seus componentes moleculares ao serem

aplicados (e.g. liposomas, microemulsões, nanoemulsões) ou, caso contrário, em partículas insolúveis (e.g. dióxido de titânio, fulerenos, pontos quânticos).

1.1. Propriedades dos Nanomateriais Manufaturados

Se as propriedades dos materiais, em geral, dependem da sua composição físico-química e do meio ambiente na interface (estado físico, temperatura, pressão), no caso dos NMs as suas propriedades distintas e atrativas devem-se, fundamentalmente, à reduzida dimensão das partículas e a modificações ao nível da estrutura que conduzem a um aumento da área superficial em relação ao volume, tendo por consequência um aumento do número de moléculas/átomos na superfície.

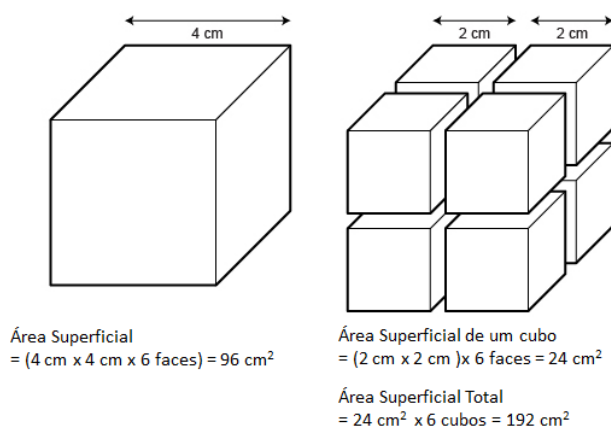


Figura 2. Ilustração do aumento da área superficial com a diminuição da dimensão das partículas. Por exemplo, um cubo sólido com 4 cm de lado tem uma área superficial de 96 cm^2 ; um volume equivalente preenchido com cubos de 2 cm de lado tem uma área superficial total de 192 cm^2 .

A importância da área superficial dos NMs nas interações biológicas tem conduzido ao debate sobre qual a métrica correta a utilizar nos estudos com os NMs, uma vez que a dose expressa em massa pode não ser o fator mais determinante para os efeitos observados (Boverhof; David, 2010). Se a área superficial foi sugerida como a métrica mais adequada, outros propõem utilizar o número de partículas (revisto em Boverhof; David, 2010) mas na ausência de um consenso, é fundamental que os estudos realizados com NMs incluam a caracterização de parâmetros como a dimensão das partículas, área superficial, número de partículas, para além da massa (Boverhof; David, 2010).

Por outro lado, o comportamento dinâmico dos nanomateriais, ou seja, a sua capacidade de formação de agregados ou aglomerados, determina a dimensão real das partículas que vão interagir com os sistemas biológicos (Oberdörster, G., 2010), podendo condicionar também a sua toxicidade (Maynard; Warheit; Philbert, 2011).

De um modo geral, nas dispersões dos NMs em meio líquido existem pelo menos três tipos distintos de forças (Figura 3): electrostáticas, estéricas e de van der Waals e os NMs nessas dispersões podem existir como partículas primárias, agregados ou aglomerados (OECD, 2012).

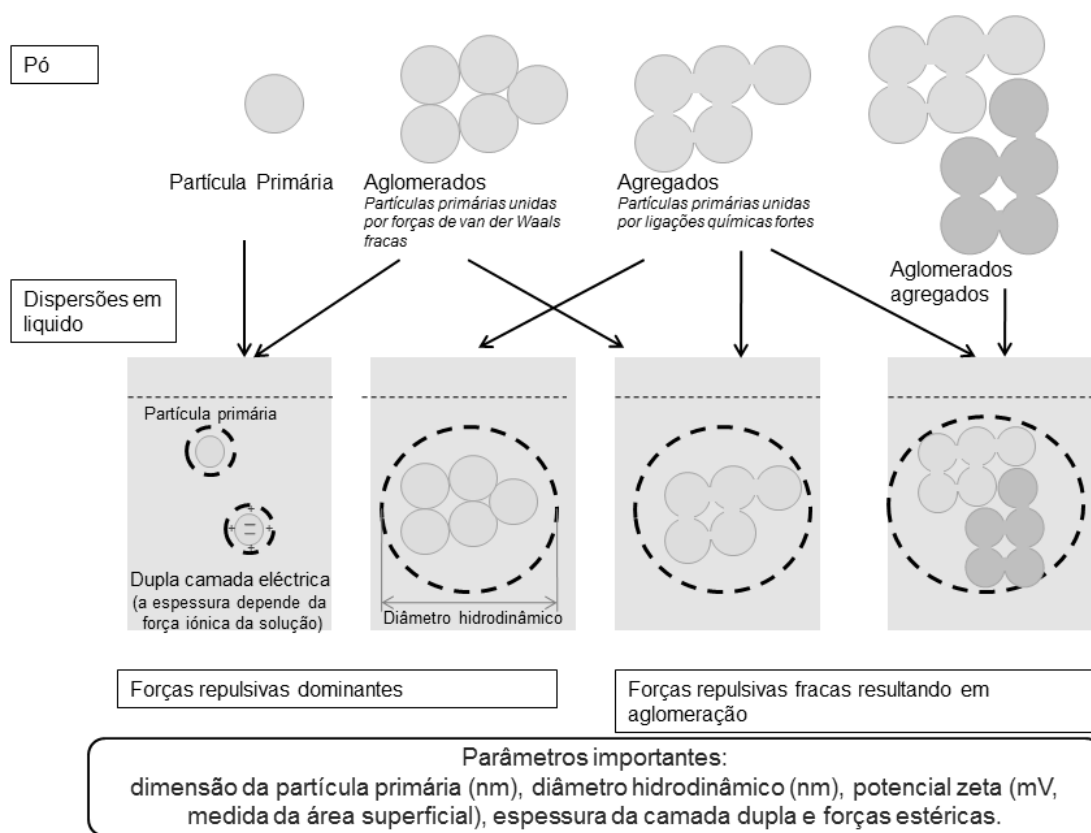


Figura 3. O comportamento dinâmico dos nanomateriais. No ar, depende da termodinâmica e aerodinâmica para a formação de aglomerados e agregados; em meio líquido depende das dimensões hidrodinâmicas dos NMs primários, aglomerados e agregados (adaptado de Oberdörster, G., 2010).

Tal como foi referido, enquanto os agregados de NMs consistem em partículas primárias unidas por ligações químicas fortes (tipo covalente), nos aglomerados, as partículas primárias estão unidas por forças de van der Waals fracas, sendo, as suas propriedades fortemente influenciadas pelo meio em que se encontram (Oberdörster, G., 2010).

Estas características dos NMs conferem-lhes propriedades de superfície únicas que, por sua vez, modificam a sua reatividade, frequentemente melhorando as suas propriedades mecânicas, óticas, elétricas e magnéticas, comparativamente às dos materiais com a mesma composição físico-química mas de dimensões maiores (Oberdörster, G., 2010; SCENIHR, 2009a).

1.2. Aplicações dos Nanomateriais Manufaturados: as Nanotecnologias

As modificações de reatividade que se verificam nos NMs em comparação com os seus análogos de dimensões normais têm dado uma contribuição significativa para o desenvolvimento e produção em quantidades significativas de uma geração de produtos inovadores contendo NMs, com um vasto campo de aplicações em áreas como a eletrónica, alimentação, cosmética e biomedicina (Wijnhoven *et al.*, 2010) tal como se especifica na Tabela 1.

Tabela 1. Alguns exemplos de aplicações de nanomateriais manufaturados, em produtos de utilização correntes e de consumo humano (adaptado de Wijnhoven *et al.*, 2010).

Categorias de Produtos	Exemplos
Produtos de aplicação biomédica	Sistemas de terapêutica dirigida (<i>targeted drug-delivery</i>); sistemas de diagnóstico; pele ou osso artificial para medicina regenerativa; Ligaduras; aparelhos de audição; próteses ortopédicas
Produtos de cuidado/uso pessoal e cosmética Aparelhos elétricos	Protetores solares; champôs; cremes; desodorizantes; pasta de dentes; produtos de maquilhagem; joalharia Frigoríficos; máquinas de lavar; ar condicionado
Electrónica e computação	Audio; vídeo; <i>hardware</i> ; televisão; telemóveis; baterias
Produtos domésticos e de construção	Produtos de limpeza; utensílios de cozinha; almofadas; tintas; materiais de construção
Têxteis	Roupa; lençóis; tecidos impermeabilizados para decoração
Embalagens	Embalagens alimentares e sensores nas embalagens alimentares
Desporto	Raquetes; tacos de golf; bolas de <i>bowling</i>
Veículos automóveis	Tinta; pneus; sistemas de purificação do ar; limpeza do motor

A título de exemplo, o dióxido de titânio é utilizado na forma “nano” em protetores solares exibindo as mesmas propriedades de filtro ultravioleta que a forma convencional, com a vantagem de ser invisível na pele (TGA, 2013). Estes NMs são usados nos protetores solares desde 1990 e inserem-se numa das categorias de produtos que tem tido um maior incremento, a dos “Produtos de Cuidado Pessoal e Cosméticos” (Wijnhoven et al, 2010). Outro exemplo é a utilização de nanotubos de carbono para controlar ou aumentar a condutividade de materiais, com aplicações variadas que vão desde embalagens anti-estáticas até aparelhos eletrónicos.

A clara expansão deste mercado nos últimos anos é visível na base de dados da Woodrow Wilson “Nanotechnology Consumer Products Inventory”, onde são identificados 1317 produtos contendo NMs, produzidos por 587 empresas em 30 países (<http://www.nanotechproject.org/>).

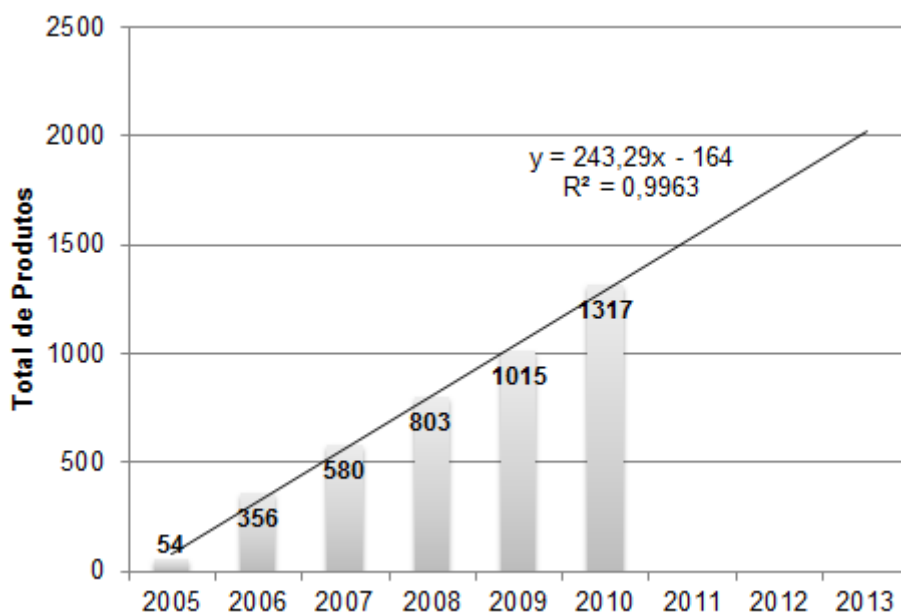


Figura 4. Número total de produtos de consumo humano contendo nanomateriais existentes na base de dados, incluindo informação até Março de 2011 (<http://www.nanotechproject.org/>).

Relativamente a produtos de consumo humano contendo NMs, o seu número no mercado europeu cresceu 6 vezes em 3 anos, totalizando 858 produtos em 2010 (Wijnhoven et al., 2010). Para além disso, a crescente aplicação dos NMs à biomedicina, a Nanomedicina (Oberdörster, G. 2010), preconiza cuidados de saúde mais eficientes e menos dispendiosos. Assim, plataformas como a “European Technology Platform on NanoMedicine” (<http://www.etp-nanomedicine.eu>) têm surgido

um pouco por todo o mundo, na expectativa de desenvolver novas soluções terapêuticas com o consequente valor acrescentado para a saúde humana e para a sociedade (Comissão Europeia, 2013).

A maioria da produção e utilização de NMs, realizada principalmente por grandes multinacionais, tem ocorrido nos Estados Unidos da América (49%) sendo a União Europeia (UE) responsável por 30% do mercado produtor (Aitken *et al.*, 2006). Entre 2000 e 2010, os cinco principais requerentes de patentes na área da nanotecnologia foram a IBM, Samsung Electronics, TDK Corp, Canon KK e Fujitsu Ltd. (Eugénio; Fatal, 2010). A actividade de patenteamento na área da bionanotecnologia em 2003 era liderada por empresas americanas, com 70% de patenteamento (Eugénio; Fatal, 2010). Em 2008, cinco anos depois, a actividade de patenteamento teve um aumento de 160% com 7399 patentes registadas. Relativamente a Portugal, o número de patentes é bastante inferior, ou seja, foram pedidas apenas 14 patentes (Eugénio; Fatal, 2010). Relativamente a aplicações da nanotecnologia para a terapia e diagnóstico do cancro em Portugal, foram efectuados, pelo menos, cinco pedidos de patente relativos a nanopartículas, essencialmente envolvendo nanomateriais lipídicos para *drug-delivery* (Parreira; Eugénio, 2011). Assim, segundo aquelas autoras, a investigação em Portugal encontra-se a acompanhar a tendência internacional da aposta na nanotecnologia para o diagnóstico e terapia do cancro.

1.3. A produção e desenvolvimento de Nanomateriais em Portugal

Na tentativa de melhor caracterizar a situação portuguesa relativamente à produção e desenvolvimento de NMs, uma pesquisa no site <http://www.nanowerk.com> revelou a rede de investigação existente em Portugal, bem como a existência de quatro empresas especificamente envolvidas na produção de nanomateriais.

Tabela 2. Nanotecnologia em Portugal (baseado na pesquisa em <http://www.nanowerk.com>; consulta em Outubro de 2013).

Investigação em Nanotecnologia

Ciceco - Centro de Investigação em Materiais Cerâmicos e Compósitos

Tem por missão o desenvolvimento da base do conhecimento científico e tecnológico necessário para a produção e transformação inovadora de materiais cerâmicos e compósitos. Uma das suas linhas de investigação é a área dos Materiais Avançados Micro e Nanoestruturados. <http://www.ciceco.ua.pt/>

INL - Laboratório Ibérico de Nanotecnologia

Organização de investigação internacional na Europa na área da nanociência e da nanotecnologia, com base em Portugal em Espanha. <http://inl.int/>

NRD - Nanotechnology Research Division

Grupo da Universidade de Aveiro envolvido em projectos de investigação de nanotecnologia, incluindo nanomateriais de carbono de diamante nanocristalino. <http://nrd.web.ua.pt/NRD>

CeNTI - Centre for Nanotechnology and Smart Materials

Instituto público-privado para investigação em nanomateriais, desenvolvimento e protótipos, em Vila Nova de Famalicão. Tem o objectivo de apoiar empresas e seus parceiros no desenvolvimento de nanotecnologias através da disponibilização de instalações e apoio especializado. <http://www.centi.pt/>

I3N- Institute of Nanostructures, Nanomodelling and Nanofabrication

Laboratório Associado que constitui uma das maiores instituições na área das nanociências e nanotecnologia. Parceria entre o IPC (Institute for Polymers and Composites, Universidade do Minho), CENIMAT (Materials Research Center, Universidade Nova de Lisboa) e o FSCOSD (Physics of Semiconductors, Optoelectronics and disordered Systems, Universidade de Aveiro). <http://www.i3n.org/default.aspx>

PToNANO

Protocolo de colaboração na área da nanotecnologia celebrado em 2013 entre o INSA, Direcção-Geral de Saúde, Instituto Português da Qualidade e Instituto de Soldadura e Qualidade.

Organizações Comerciais

Fluidinova

Produtor de nanoXIM®, hidroxiapatite nanocristalina, que é fornecida mundialmente para a produção de aplicações em dispositivos médicos, produtos de cuidado pessoal, investigação, entre outras aplicações. <http://www.fluidinova.com/>

Innovnano

Subsidiária da química CUF, opera na área da nanotecnologia e materiais cerâmicos de elevado desempenho. <http://www.innovnano.pt/>

Metoxid

Desenvolve uma vasta gama de pós nanocerâmicos, óxidos, compósitos, etc.

TreatU

Dedica-se ao desenvolvimento de plataformas de *drug-delivery* baseadas em nanotecnologias, tendo patentado recentemente nos EUA (em 2012) o PEGASEMP, NM para tratamento do cancro da mama. <http://treatu.pt/>

NANOLABEL - NANOPARTÍCULAS BIOCOMPATÍVEIS, LDA.

Investigação e desenvolvimento de produtos e processos biológicos utilizando a nanotecnologia para aplicações nas áreas da saúde, biologia, cosmética, têxteis e bio-sensorização.

No entanto, tudo leva a crer que este seja um panorama incompleto devido à inexistência de um sistema centralizado de dados, a nível nacional.

Um trabalho muito recente analisou os projetos de investigação realizados sobre NM em Portugal (Casimiro; Santos, 2011), onde se concluiu que entre 2006-2009 foram financiados 108 projectos no domínio das nanotecnologias, dos quais somente 2 abordavam o tema da nanosegurança. Portugal participou ainda em 24 projetos de I&D no âmbito do 7º Programa-quadro da UE e numa Ação Concertada sobre a segurança de NMs, promovida pela Agência Executiva para a Saúde e Consumidores (*Executive Agency for Health and Consumers*, EAHC) da Comissão da EU (Casimiro; Santos, 2011). Estes números, sugerem o elevado interesse nacional, em particular na área das aplicações em nanotecnologia.

Pelo que foi mencionado, reconhece-se que o crescente desenvolvimento, produção e utilização de NMs manufaturados tem conduzido a um aumento real da exposição humana, especialmente no contexto ocupacional. No entanto, a informação sobre os níveis de NMs a que a população humana pode estar sujeita ainda é escassa, quer relativamente aos consumidores, quer aos locais de trabalho ou ao ambiente.

2. EXPOSIÇÃO HUMANA A NANOMATERIAIS MANUFATURADOS

A exposição humana a NMs pode ocorrer durante as várias fases do ciclo de vida dos NMs (Figura 5), desde a sua síntese, produção e inclusão nos produtos (exposição ocupacional), até à utilização desses mesmos produtos (exposição do consumidor). A eliminação dos NMs e consequente acumulação no ambiente poderá constituir ainda uma fonte de exposição humana (exposição ambiental).

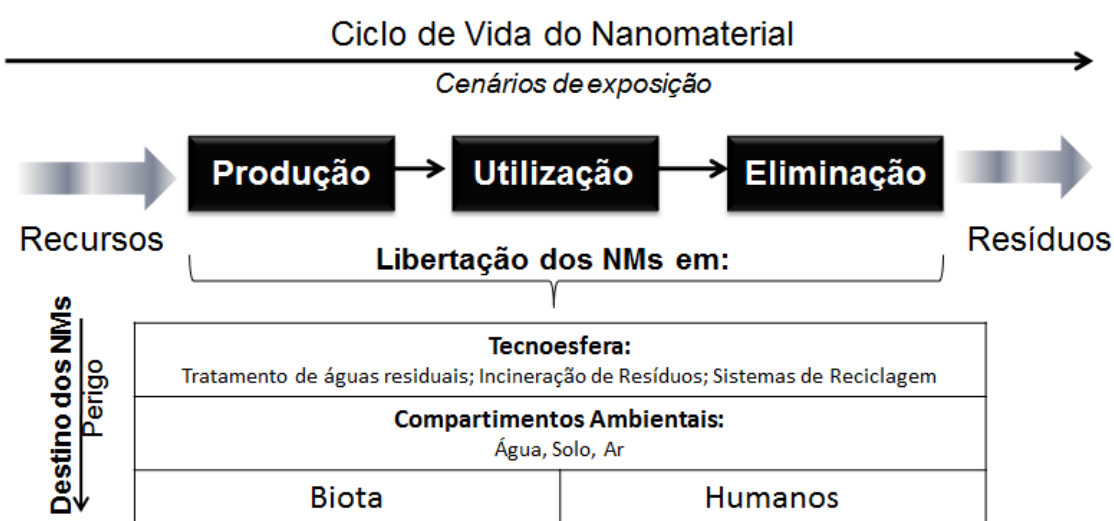


Figura 5. Esquema simplificado das fases do ciclo de vida de um nanomaterial manufaturado (adaptado de Som *et al.*, 2010).

Considerando o ciclo de vida de um NM, as potenciais fontes de exposição a NMs podem envolver o contexto ocupacional, mas também os consumidores e o ambiente. No entanto, existe muito pouca informação sobre a libertação de NMs, ou estimativas de exposição para os consumidores, locais de trabalho ou ambiente (Becker *et al.*, 2011; Aitken *et al.*, 2006). O ponto da situação para os países nórdicos (Dinamarca, Finlândia, Islândia, Noruega, Suécia) foi apresentado no relatório de Schneider (Schneider, 2007), demonstrando a existência de uma grande diversidade de cenários de exposição concebíveis durante o ciclo de vida dos NMs, envolvendo trabalhadores (especializados e não especializados) mas também utilizadores. Porém, em muitos países, tal como no nosso, tais dados não se encontram disponíveis e a informação sobre a exposição de consumidores/utilizadores aos NMs é ainda muito reduzida, a nível internacional e nacional. Isto decorre do facto de, na maioria dos países, a colocação da designação “nano” nos rótulos dos produtos de consumo não

ser fundamentada legalmente e, de acordo com o relatório do Instituto Holandês para a Saúde Pública e Ambiente (RIVM), alguns produtos com esta indicação não contêm realmente NMs, enquanto outros incorporam NMs e não o referem (Oomen *et al.*, 2011). Não existe, portanto, um sistema de rastreabilidade que possibilite aos consumidores estarem informados corretamente sobre a presença de NMs nos produtos existentes no mercado e, como tal, estarem cientes da possibilidade de estarem expostos a esses materiais, dificultando a percepção do risco.

A Figura 6 ilustra as inúmeras possíveis fontes de exposição a NMs, tendo em consideração as aplicações presentes e futuras destes materiais em produtos de consumo humano.

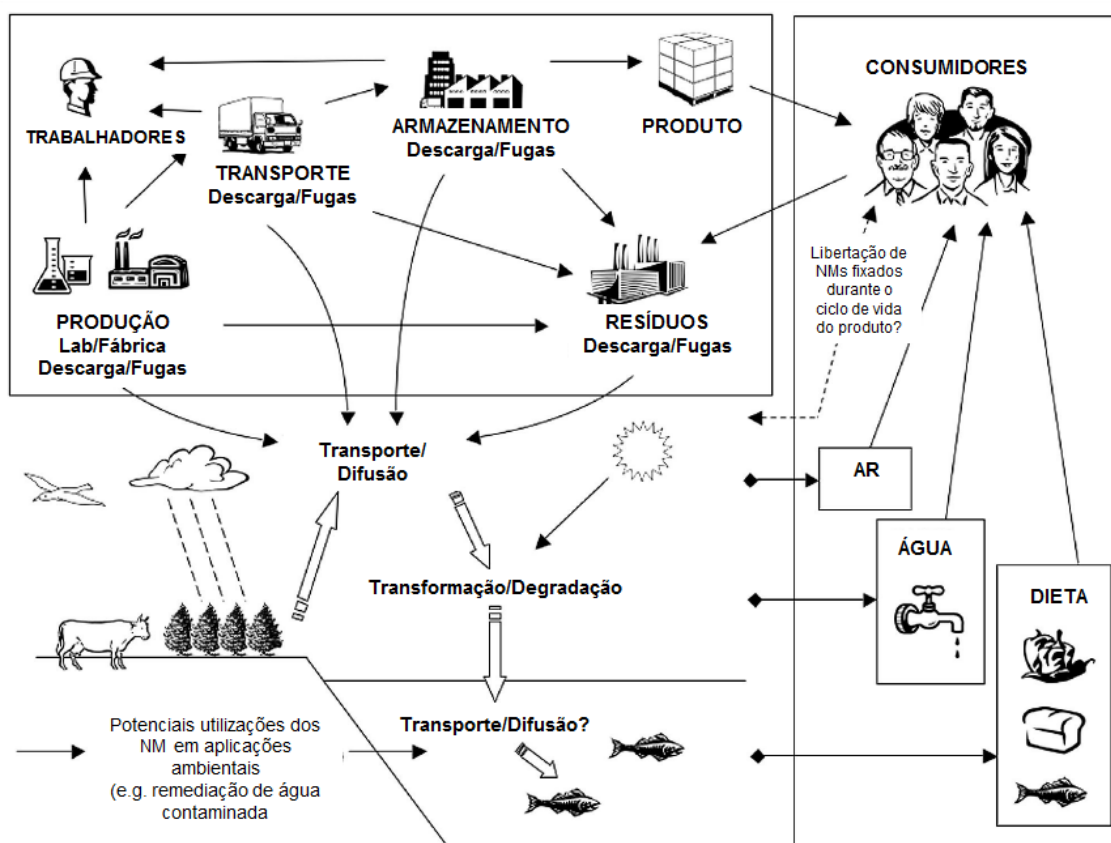


Figura 6. Possíveis fontes de exposição a NMs, com base nas aplicações actuais e futuras (adaptado de The Royal Society & the Royal Academy of Engineering, 2004).

Se o NM for libertado para o ar no decurso da sua produção, poderá ser inalado. Por sua vez, a utilização de produtos de cosmética permite o contacto dérmico com o NM, ou este poderá ser ingerido quando associado a aplicações alimentares. Também a nanomedicina, enquanto aplicação de intervenções médicas à

escala molecular para curar doenças ou reparar tecidos danificados (Oberdörster, G. 2010), poderá conduzir à exposição dos doentes, frequentemente por administração sistêmica, e também dos trabalhadores que realizam as intervenções.

2.1. Exposição ambiental

Existem poucos estudos que descrevam a presença de NMs nos compartimentos ambientais, a sua transferência entre eles ou a sua libertação a partir dos produtos de consumo humano em que são utilizados. Um desses estudos registou a libertação de TiO_2 na lixiviação de fachadas exteriores, enquanto outras evidências sugerem a libertação de NMs de prata incorporados nos têxteis comerciais durante as lavagens (revistos por Gottschalk; Nowack, 2011).

Alguns estudos têm procurado estimar a concentração ambiental de NMs através de modelação. Na Suíça, um estudo descreve a modelação das quantidades de NMs libertadas para o ambiente, utilizando uma análise do seu ciclo de vida (Mueller; Nowack, 2008).

Tabela 3. Concentração ambiental prevista de NMs no ar, água e solo, na Suíça (adaptado Mueller; Nowack, 2008).

	Dióxido de Titânio			Nanotubos de Carbono	
	Unidade	RE	HE	RE	HE
Ar	$\mu\text{g}/\text{m}^3$	$1,5 \times 10^{-3}$	$4,2 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-2}$
Água	$\mu\text{g}/\text{l}$	0,7	16	0,0005	0,0008
Solo	$\mu\text{g}/\text{kg}$	0,4	4,8	0,01	0,02

RE: cenário realista; HE: cenário de elevada emissão.

Comparando estes valores com os dados existentes sobre *No Observed Effect Concentration*, os autores sugerem que a concentração de TiO_2 na água representa um risco para a vida aquática, especialmente no cenário de elevada exposição, que deve ser averiguado. Por sua vez, as concentrações previstas de nanotubos de carbono possivelmente representam pouco risco. No entanto, os autores ressaltam o facto de este estudo não distinguir entre os NMs do mesmo grupo, sendo que a dimensão e a funcionalização dos NMs irá influenciar de modo determinante o seu destino ambiental (Mueller; Nowack, 2008).

Mais recentemente, foi descrita a quantificação de riscos associados aos NMs presentes na água e no solo, com base na exposição probabilística e modelação dos

efeitos (Gottschalk; Kost; Nowack, 2013) relativamente a NMs de prata, dióxido de titânio (TiO_2), óxido de zinco (ZnO), nanotubos de carbono (NTCs) e fulerenos. Os resultados sugerem que existe um risco muito reduzido na água superficial e risco moderado nos efluentes da água das estações de tratamento de esgotos. Também verificaram risco reduzido relativamente ao TiO_2 nos solos tratados com iodo, enquanto não detectaram riscos nos restantes compartimentos terrestres. Assim, apenas o TiO_2 constitui presentemente um risco para o ambiente. Porém, a crescente utilização de NMs poderá modificar este cenário num futuro próximo.

Efetivamente, um outro estudo combinou a informação dos artigos científicos com as patentes registadas nos EUA, para estimar o limite superior do impacto ambiental da produção de TiO_2 no futuro (Robichaud *et al.*, 2009). Na Figura 7, observam-se as expectativas de libertação de NMs para um futuro próximo, demonstrando o elevado impacto no ambiente que se antevê, ainda que se trate apenas de um modelo.

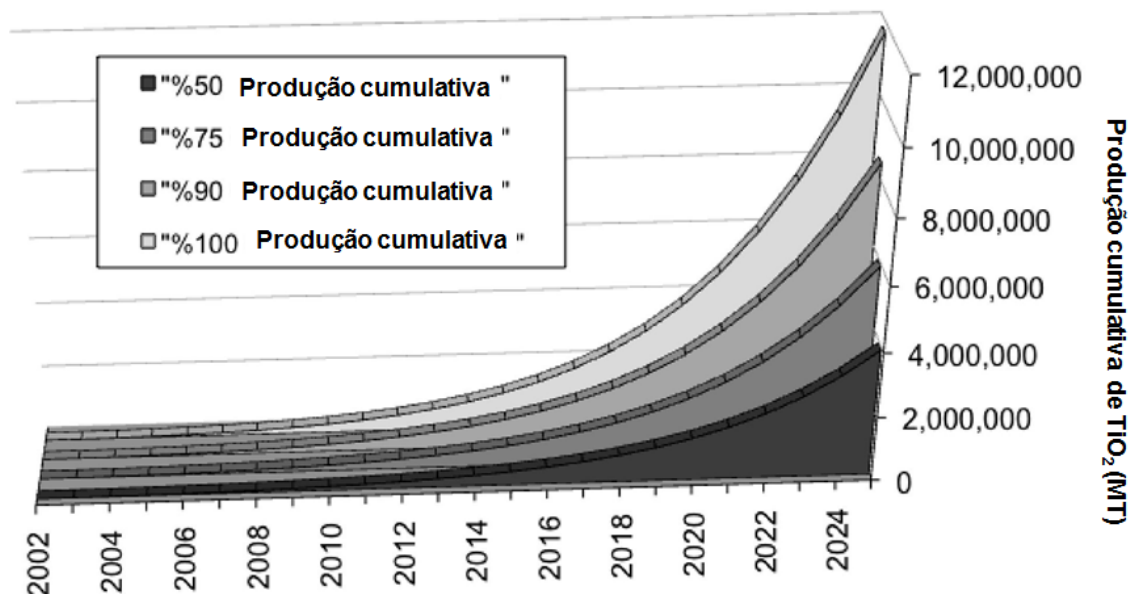


Figura 7. Previsão da libertação de TiO_2 no ambiente com base na estimativa de produção deste NM nos EUA. Os vários cenários baseam-se na libertação no ambiente de 50%, 75%, 90% ou 100% do total de produção de TiO_2 estimada (adaptado de Robichaud *et al.*, 2009).

Perante um crescimento quase certo, e tão grandes incertezas sobre a toxicidade dos NMs, é essencial produzir dados de toxicologia que permitam avaliar potenciais riscos para o ambiente e, conseqüentemente, para a saúde humana.

2.2. Exposição ocupacional

De acordo com um estudo do Instituto Francês de Investigação e Segurança (INRS), referido na revista “Travail & Sécurité” (Brasseur ; Bondeellé, 2010) a produção industrial de nanomateriais em França envolve entre 2000 a 4000 trabalhadores. Ainda assim, estima-se que a maioria da produção e utilização de NM ocorra nos EUA (49%), sendo a UE responsável por 30% (revisto em Aitken *et al.*, 2006), mas outros países contribuem também para a produção de NMs. Também as economias emergentes, como a China, investem grandemente no desenvolvimento de nanociência e nanotecnologia, prevendo-se que venham a contribuir para produção em grande escala de NMs (Bai, C., 2005).

Se considerarmos o exemplo dos nanotubos de carbono, verificamos que os seus produtores se distribuem quase por todo o mundo, embora sendo pouco relevantes no hemisfério sul (Figura 8).

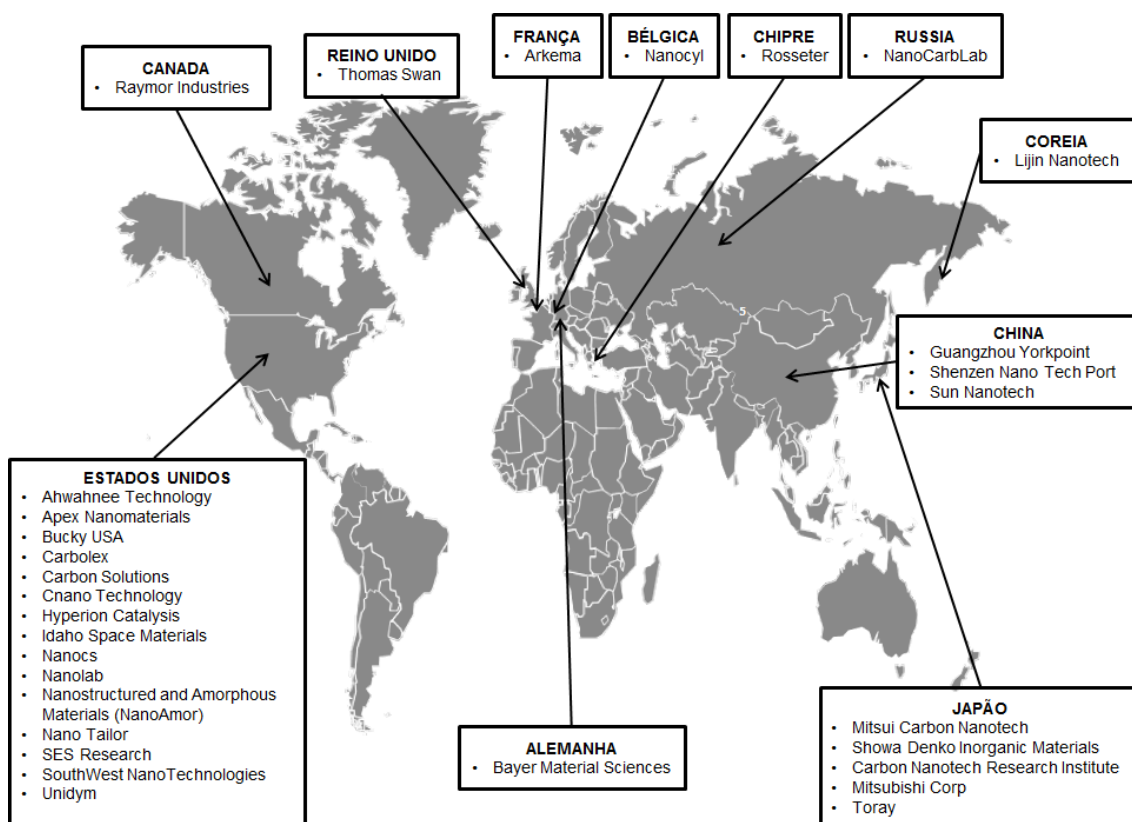


Figura 8. Distribuição mundial de produtores de nanotubos (adaptado de Pieters, 2008).

No contexto actual, pequenas empresas *start up* inundam o mercado, mas a grande contribuição para a produção de NM ocorre em grandes multinacionais como a

DuPont, BASF or Mitsubishi Chemical (Forbes/Wolfe, 2004 *cit. in* Aitken *et al.*, 2006). Como foi referido anteriormente, os principais requerentes de patentes na área da nanotecnologia foram igualmente grandes empresas (Eugénio; Fatal, 2010).

A proliferação deste tipo de indústria e de mercado, coloca a questão da exposição crescente dos trabalhadores aos nanomateriais.



Figura 9. Exemplo de dois cenários de exposição de trabalhadores a NMs ao aplicar tratamentos nos revestimentos de superfícies exteriores.

A extensão da exposição dos trabalhadores encontra-se pouco documentada, mas algumas medições realizadas nos locais de trabalho relativamente a NTCs indicam a potencial exposição dos trabalhadores (Bello *et al.*, 2009; 2008; Han *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010; Tsai *et al.*, 2009). Uma conferência recente - First International Scientific Workshop on Harmonization of Strategies to Measure and Analyze Exposure to (Manufactured) Nano-objects in Workplace Air, 2010 - focou-se na necessidade de harmonizar formalmente a estratégia de medição dos NMs nos locais de trabalho (Brouwer *et al.*, 2012).

O esforço para delinear uma estratégia de saúde ocupacional relativamente aos NMs pode ser ilustrado pelo projeto conjunto entre a indústria do mobiliário e a investigação científica conduzida pelo instituto holandês "IVAM Research and consultancy on Sustainability". Este projeto procurou responder a quatro questões: i) que tipos de NMs são utilizados na indústria do mobiliário; ii) quais as perspetivas de utilização futura de NMs na indústria do mobiliário; iii) quais os problemas de saúde e segurança associados aos NMs em contexto ocupacional e iv) como pode ser estabelecido um local de trabalho seguro. Os resultados deste projeto são descritos no relatório de Fleur van Broekhuizen "Nano in Furniture- State of the art 2012 (disponível em <https://osha.europa.eu/en/news/nano-in-furniture-project-results-available>) e estabelecem a base para uma abordagem fundamentada no princípio da precaução para salvaguardar a saúde dos trabalhadores.

Foi estimado nos EUA que, entre 1981-83, cerca de 2,7 milhões de trabalhadores se encontravam expostos a TiO₂ (IARC, 2010). Por outro lado, apenas se conhece um estudo nos EUA que se preocupou em avaliar a exposição aos NTCs, especificamente através da inalação e dérmica, durante a manipulação de material não refinado (Maynard *et al.*, 2004). Verificou-se que a formação de aerossóis respiráveis nesta manipulação era reduzida e que a exposição dérmica era minimizada através da utilização de luvas (Maynard *et al.*, 2004).

Na UE, a Agência Europeia para a Segurança e Saúde no Local de Trabalho (*European Agency for Safety and Health at Work*, EU-OSHA) estima que entre 300.000 a 400.000 postos de trabalho lidam diretamente com a nanotecnologia. Os nanomateriais fabricados são manuseados em muitos mais locais de trabalho ao longo da cadeia de abastecimento e 75% desses locais de trabalho são pequenas e médias empresas (EU-OSHA, 2012). No Reino Unido, um estudo identificou 53 empresas envolvidas em manufacturar, processar ou utilizar NM em 2005, para além de mais 55 envolvidas na I&D associada à nanotecnologia (Aitken *et al.*, 2006). Em França, de acordo com um estudo do INRS, a produção industrial de nanomateriais envolve entre 2000 a 4000 trabalhadores (citado em Brasseur; Bondeellé, 2010). Em Portugal, que se conheça, não existem dados disponíveis sobre exposição ocupacional a NMs.

Do que ficou exposto, é inequívoco que, por um lado, as nanotecnologias têm já um enorme impacto económico e estão a ser alvo de uma expansão que é impossível de reverter e que, por outro, a exposição humana a uma ampla variedade de NMs é já uma realidade que não pode ser ignorada. Por sua vez, a EU-OSHA refere a exposição ocupacional aos NMs como o risco emergente mais premente (EU-OSHA, 2009), considerando existir necessidade de investigação de todo o ciclo de vida de modo a identificar todas as situações de exposição dos trabalhadores, bem como as implicações na sua saúde.

2.3. Vias de exposição humana e toxicocinética

A presença de NMs no ar pode dever-se a processos de erosão de materiais fabricados ou à produção/utilização/manipulação de pós contendo NMs, sendo que a via inalatória constitui a via de exposição humana mais relevante, particularmente, em contexto ocupacional (Handy; Shawn, 2007). Por um lado, a reduzida dimensão dos

NMs conduz a uma maior deposição destes nas vias respiratórias (revisto em Andujar *et al.*, 2011). Aí, a inalação dos NMs pode ser responsável por efeitos fisiológicos nocivos, podendo ainda penetrar por esta via em outros órgãos e tecidos. Efetivamente, num estudo em ratos verificou-se que, após a eliminação dos NMs dos pulmões, parte dos NMs podiam ser detectados nos nódulos linfáticos (Klein *et al.*, 2012). Vários estudos sugerem a translocação epitelial, intersticial e neuronal dos NMs insolúveis inalados para outros compartimentos do corpo (revisto em Andujar *et al.*, 2011). Também foi demonstrada em ratos a possibilidade de os NMs inalados se translocarem para o cérebro (Oberdörster *et al.*, 2004). No caso de NMs de sílica amorfa sintética coberta com polímeros (mas não no caso da maioria dos NMs estudados) verificou-se a acumulação no baço, demonstrando a sua distribuição sistémica (Klein *et al.*, 2012).

Em relação à exposição por via oral, esta pode ocorrer através da ingestão de NMs incorporados em alimentos, suplementos alimentares ou mesmo em embalagens alimentares, bem como os originários de solos ou águas contaminadas. Existem evidências de que os NMs ingeridos poderão ser absorvidos através do intestino de mamíferos (Becker *et al.*, 2011) e, assim originar, eventualmente, efeitos sistémicos. Por sua vez, Wang *et al.* descreveram a acumulação de TiO₂ sobretudo no fígado, baço, rins e pulmões de ratinhos expostos oralmente a uma dose única de 5 g/kg deste NM, indicando que estes NMs podem ser transportados para outros tecidos e órgãos após absorção no trato gastrointestinal (Wang *et al.*, 2007b).

A via transdérmica poderá também ser importante (Becker *et al.*, 2011), quer em termos ocupacionais, quer quando se trata da utilização de produtos de cosmética e higiene pessoal contendo NM na sua composição. No entanto, a capacidade dos NMs penetrarem (ou não) na pele permanece ainda por esclarecer, sendo dependente de múltiplas variáveis inerentes ao NM em si e às condições de exposição da pele (Labouta *et al.*, 2011; Monteiro-Riviere *et al.*, 2011). Ainda assim, num documento recente, o Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) considera que a absorção dérmica/percutânea dos NMs contidos nos protectores solares é desprezável na pele intacta, sendo improvável que os NMs atinjam as células viáveis da epiderme (SCCS, 2013).

Deste modo, a pele humana, pulmões e trato gastrointestinal são as vias de entrada mais provável dos NMs no organismo humano, embora a injeção e a colocação de implantes sejam também vias possíveis (Figura 10).

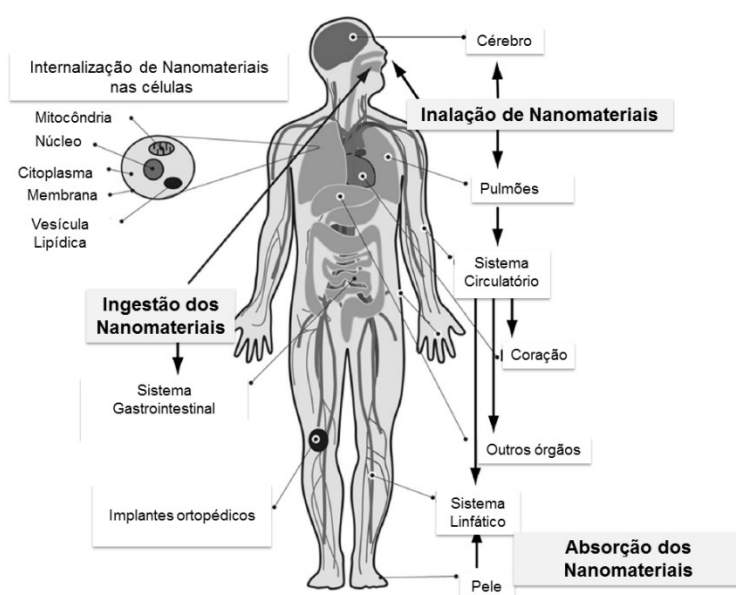


Figura 10. Representação esquemática do corpo humano, potenciais vias de exposição a NMs e órgãos afetados (adaptado de Buzea; Pacheco; Robbie, 2007).

A exposição interna a NMs através da via de administração sistêmica de NMs (intravenosa ou intraperitoneal) também foi estudada em vários organismos. Em ratinhos, após injeção intravenosa (i.v.) de 56 ou 560 mg/kg de TiO_2 em dois dias consecutivos, verificou-se a presença de aglomerados de NM no fígado, pulmão e baço (Umbreit et al, 2012), que ainda se observavam 26 semanas após i.v., indicando a acumulação interna nestes órgãos. Outros autores descreveram a bioacumulação de TiO_2 após i.v. (Fabian *et al.*, 2008; Olmedo *et al.*, 2008). Também outros NMs, como os nanotubos de carbono de parede múltipla (MWNCTs), foram detectados em órgãos de ratinhos injectados, acumulando-se em especial no fígado (revisto por Riviere, 2009).

Após a absorção e, uma vez no interior do organismo, os NMs têm a capacidade de se translocarem para o sistema circulatório e linfático, em consequência das suas pequenas dimensões, (revisto por Buzea; Pacheco; Robbie, 2007). Algumas aplicações promissoras dos NMs em biomedicina, como a injeção de nanocapsulas lipídicas, conseguem mesmo atravessar a barreira hemato-encefálica (Huynh *et al.*, 2009). Efetivamente, em relação a diversas barreiras biológicas internas, uma revisão recente sugere a propensão dos NMs as atravessarem, depositando-se e lesando os órgãos alvo (Pietroiuisti *et al.*, 2013).

Apesar de todas estas vias de entrada no organismo humano serem possíveis, os estudos que analisam a exposição real do ser humano a NMs são escassos, como veremos nos casos do TiO_2 , NTCs e ZnO .

3. ANÁLISE DE RISCO E SEGURANÇA DOS NANOMATERIAIS MANUFATURADOS

Considerando o paradigma de análise de risco (*risk analysis*) convencional, que incorpora três componentes: avaliação do risco (*risk assessment*), gestão do risco e comunicação do risco (OMS, 2010), tem surgido a dúvida sobre a sua aplicabilidade ao caso dos NMs. A avaliação do risco inclui a identificação do perigo, através de estudos sobre a toxicidade, a avaliação da exposição humana e, por último, a caracterização do risco, através de estudos de índole mais mecanística.

Relativamente à toxicidade dos NMs, tem-se assumido que estes apresentam, pelo menos, a mesma toxicidade que os materiais na forma não nanométrica. No entanto, a observação de que os mesmos constituintes, quando estruturados na forma “nano”, revelam propriedades físico-químicas distintas das do material de origem, com consequente alteração potencial da sua reatividade nos sistemas biológicos (Oberdörster, G. 2010), coloca em causa a aplicabilidade das metodologias convencionais à avaliação de efeitos adversos dos NMs, gerando também incertezas sobre a robustez dos resultados já publicados.

Neste contexto, a Resolução do Parlamento Europeu, de 24 de Abril de 2009 a propósito dos aspetos regulamentares dos nanomateriais destaca a ausência de informação e de conhecimentos científicos suficientes para tal extrapolação na área dos NMs, aconselhando a intervenção da Comissão das Comunidades Europeias para colmatar estas falhas e adequar a legislação existente (Parlamento Europeu, 2010). O conjunto da regulamentação europeia existente encontra-se descrito abreviadamente na Tabela 4.

Tabela 4. Resumo da Regulamentação Europeia sobre NM (com base em Comissão Europeia, 2012b).

Âmbito	Regulamentação
Definição de Nanomaterial	Recomendação 2011/696/UE da Comissão, 20.10.2011- sobre a definição de nanomateriais.
Código de conduta	C(2008) 424 final 07/02/2008 – para nanociências responsáveis e investigação em nanotecnologias.
Regulamentação dos NMs	Comunicação da Comissão ao Parlamento Europeu, ao Conselho e ao Comité Económico e Social Europeu - Segunda revisão regulamentar relativa a «nanomateriais». COM(2012) 572 final, Bruxelas, 3.10.2012.
Químicos	<p>REACH- Regulation (EC) No 1907/2006; OJ L 396 de 30.12.2006- Legislação abrangente relativo ao Registo, Avaliação, Autorização e Restrição dos Químicos. Baseia-se no princípio que os fabricantes/importadores e utilizadores a jusante têm que assegurar que fabricam, colocam no mercado ou usam substâncias que não possuem efeitos adversos na saúde humana ou ambiente.</p> <p>Regulamento CRE - Regulamento (CE) n.º 1272/2008, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, JO L 353 de 31.12.2008</p> <p>CA/59/2008 rev 1- NM no âmbito do REACH: os NM estão sujeitos aos procedimentos REACH</p> <p>Projeto de implementação do REACH sobre identificação de nanomateriais ou da substância (RIPoN) em matéria de requisitos de informação (RIPoN2) e RIPoN sobre avaliação de segurança química (RIPoN3) – avaliar se os atuais requisitos REACH e as orientações pertinentes são adequados para avaliar os nanomateriais.</p>
Trabalhador	<p>Directiva 89/391/EEC- Medidas para a segurança e protecção da saúde dos trabalhadores.</p> <p>Directiva 2004/37/EC de 29-4-2004; OJ L 158, 30.4.2004 - Protecção de riscos de exposição a carcinógenos ou mutagénicos.</p> <p>Directiva 98/24/EC de 7-4-1998; OJ L 131, 5.5.1998 – Protecção de riscos de exposição a agentes químicos.</p> <p>Directiva 89/655/EEC de 30-11-1989; OJ L 393, 30.12.1989- Utilização de equipamento.</p> <p>Directiva 89/656/EEC de 30-11-1989; OJ L 393, 30.12.1989 – Utilização de equipamento de protecção</p> <p>Directiva 1999/92/EC de 16-12-1999; OJ L 23, 28.1.2000- Protecção de riscos de exposição atmosferas explosivas</p>
Produtos	<p>Regulamento (CE) No 1223/2009 do Parlamento Europeu do Conselho de 30 de Novembro de 2009, relativo aos produtos cosméticos- exige a notificação de produtos de cosmética contendo NMs, bem como a inscrição no rótulo do nome do ingrediente seguido da palavra “nano” entre parêntesis; em vigor desde Julho de 2013.</p> <p>Directiva 2001/95/EC; OJ L 11, 15.1.2002- Respeita a produtos medicinais, cosméticos, alimentos e aditivos alimentares.</p> <p>Diretiva 2001/83/EC de of 6 November 2001 – Regulamentação para produtos medicinais de uso humano.</p>
Ambiente	<p>Directiva 2008/1/EC – sobre prevenção e controlo integrado de poluição; OJ L 24, 29.01.2008</p> <p>Directiva 2000/60/EC,OJ L 327, 22.12.2000- Água.</p> <p>Directiva 2006/12/EC – Sobre desperdícios.</p>

Assim, as especificidades dos NMs devem ser consideradas para uma adequada análise de risco, através do conhecimento gerado por uma área específica da toxicologia, a Nanotoxicologia (Oberdörster; Oberdörster; Oberdörster, 2005).

Em 2009, com base no Regulamento REACH sobre Registo, Avaliação, Autorização e Restrição dos Químicos (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*), a UE iniciou Projectos de Implementação do REACH para NMs (*REACH Implementation Project on Nanomaterials*, RIPoNs) com vista a adaptar os guias de orientação REACH aos NMs. Estas ações de implementação visaram fornecer informação científica relevante à Agência Europeia dos Químicos (ECHA), nomeadamente no sentido de adaptar os protocolos experimentais do REACH aos NMs. Foi concluído ainda que substâncias nas formas nano devem ser registadas separadamente, independentemente do seu volume e sempre que as suas propriedades forem diferentes da substância original.

Atualmente, de acordo com o REACH (Comissão Europeia, 2008), a avaliação da segurança dos nanomateriais deve seguir a metodologia de avaliação de risco adotada para os compostos químicos convencionais (Figura 11), envolvendo três passos: 1) avaliação de efeitos adversos; 2) avaliação da exposição e 3) caracterização do risco.

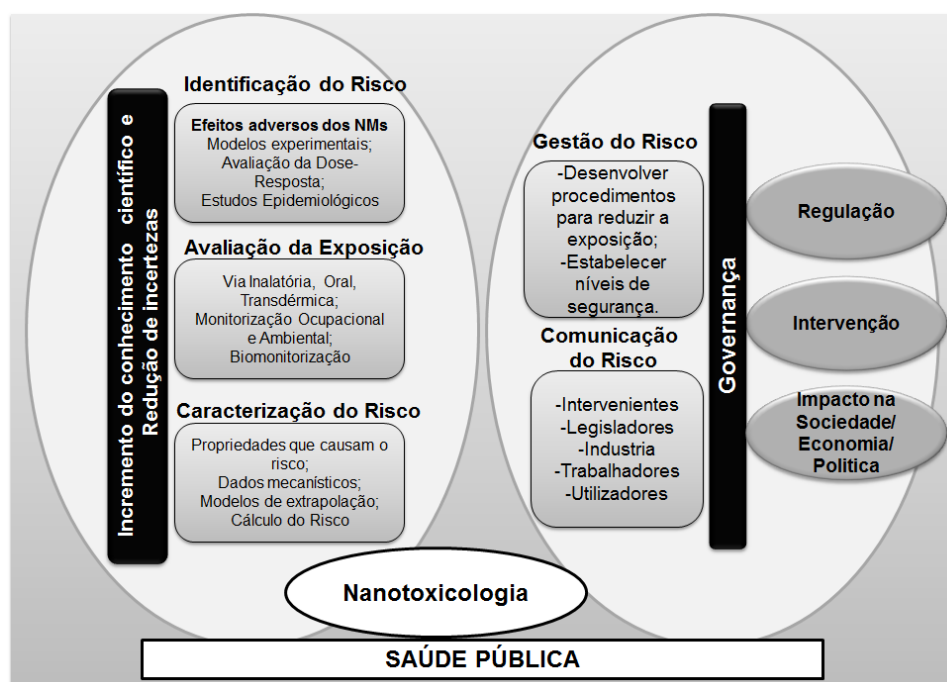


Figura 11. Elementos chave na análise de risco dos nanomateriais, sua conexão com a nanotoxicologia e interação com a Saúde Pública (Louro; Borges; Silva, 2013).

No que diz respeito à avaliação de efeitos adversos (passo 1), o quociente de risco (*Risk Characterisation Ratio*, RCR) é considerado aceitável quando o valor estimado da exposição é inferior à dose/concentração do agente em que não se observou efeito adverso (*No Observed Adverse Effect Level*, NOAEL) no estudo experimental levado a cabo para avaliar o *endpoint* em estudo (p.ex., toxicidade por inalação, genotoxicidade), ou seja, quando $RCR < 1$. No caso de ser necessário efetuar ensaios *in vivo* ou *vitro* para avaliar os efeitos, torna-se necessário primeiro caracterizar o NM em estudo, recolhendo informação sobre os parâmetros físico-químicos mais relevantes e que poderão influenciar a toxicidade tais como, distribuição de tamanhos, estado de agregação/aglomeração, forma, área superficial, reatividade, solubilidade em água, carga superficial e estabilidade. Salienta-se desde já, no entanto, que o poder preditivo em termos de toxicidade, do binómio propriedades intrínsecas - efeitos observados é ainda baixo, devido à já referida insuficiente evidência científica e à falta de protocolos experimentais validados, impossibilitando a extrapolação de resultados ou a associação de um determinado perfil toxicológico a um certo(s) tipo(s) de NM (van Benthem, 2007). Para avaliar a exposição (passo 2), torna-se necessário identificar todas as potenciais fontes de exposição. Neste sentido, é importante conhecer o processo de fabrico, as atividades envolvidas e os diferentes cenários de exposição, assim como identificar as vias de exposição mais prováveis. Este tipo de informação também é relevante para decidir a estratégia de teste adequada (que estudos e que vias de administração) e a elaboração de recomendações sobre medidas de prevenção do risco. Estas podem incluir o uso de equipamento de proteção individual com especificações definidas (máscaras de proteção nível 3 -FFP3), uso de filtros HEPA, e ainda a implementação de medidas operacionais tais como a extração forçada de ar no posto de trabalho – LEV (Local Exhaust Ventilation), redução da duração das tarefas, e de uma maneira geral, formação relativa a Boas Práticas de Fabrico.

Logo após a implementação do RIPoN, uma análise de incerteza demonstrou que existem lacunas no conhecimento em quase todos os aspetos relacionados com a caracterização do risco (passo 3), designadamente potenciais riscos para a saúde e ambiente associados aos NMs (Grieger *et al.*, 2010). A Comunicação da Comissão das Comunidades Europeias sobre aspetos regulamentares dos nanomateriais expressou a mesma incerteza, ao salientar a existência de lacunas relativamente às questões de segurança dos NMs, salvaguardando a possibilidade de modificar a legislação existente mediante novas informações (SCCP, 2007). No mesmo sentido, foram criados vários grupos de trabalho, tais como:

- **Nano Support Project** - JRC em cooperação com a ECHA. Parte 1 (identificação dos dossiês de registo que abrangem nanomateriais, avaliação científica e propostas para colmatar lacunas) – realizado e disponível em http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/pdf/jrc_report.pdf.

- **Nano Support Project** - JRC em cooperação com a ECHA. Parte 2 (avaliação das potenciais consequências económicas e ambientais das propostas técnicas efetuadas na tarefa I); prevista para outubro de 2013.

- **GAARN** (Group on Assessing Already Registered Nanomaterials)- grupo sobre avaliação de nanomateriais já registados – grupo informal para avaliar três dossiês de registo selecionados sobre nanomateriais; Criado em 2012, conclusão dos trabalhos prevista para 2013.

- **Grupo de trabalho ECHA Nanomateriais** – Grupo Permanente para aconselhar a ECHA sobre aspetos científicos e técnicos relacionados com os nanomateriais; criado em 2012.

Assim, é notório no documento mais recente da Comissão Europeia sobre os NMs (Comissão Europeia, 2012b) o elevado esforço internacional que se encontra em curso para avaliação e gestão dos riscos associados à exposição a estes materiais, por forma a garantir a sua utilização em consonância com elevado nível de saúde pública, segurança e proteção dos consumidores, trabalhadores e ambiente.

Presentemente, perante os novos produtos baseados em nanomateriais e as incertezas no que se refere à sua segurança aplica-se, de uma forma geral, o princípio da precaução, enquadramento utilizado para a regulação de tecnologias emergentes que possam constituir potenciais ameaças graves para a saúde ou para o ambiente (Warshaw, 2012). O princípio da precaução preconiza a necessidade de atuar para reduzir potenciais efeitos adversos antes de existir uma prova cabal desses efeitos, tendo em consideração os prováveis custos e benefícios da ação *versus* inação.

Lamentavelmente, são variados os exemplos de um passado recente em que tecnologias emergentes com enorme potencial para aplicações industriais ou médicas se revelaram tardiamente como nocivas para o ser humano e para o ambiente (EEA, 2013; 2001). Um desses exemplos foi a produção e ampla utilização das fibras de asbestos para fins industriais e revestimentos na construção civil, que se verificou na segunda metade do século XX. Apesar de repetidos alertas quanto aos seus potenciais efeitos adversos para o homem, estes foram ignorados prevendo-se, em consequência, um acréscimo da ordem dos milhares de casos de mesotelioma e de cancro do pulmão, nos próximos vinte e cinco anos. Outro caso paradigmático é o dos

raios-X, cuja utilização se banalizou após a sua descoberta no final do século XIX, dadas as suas potencialidades para diagnóstico e terapêutica. Embora os seus efeitos agudos tenham sido precocemente reconhecidos, os efeitos a longo prazo, resultantes da exposição repetida, foram ignorados durante mais de cinquenta anos, sendo que apenas em 1949 o *International Commission on Radiation Protection* (ICRP) reconheceu que se deveria minimizar a exposição ao raio-X devido ao seu efeito cancerígeno. Contudo, só em 1996 foi publicada a Directiva Europeia sobre radiação ionizante baseada nos limites de dose estabelecidos pelo ICRP alguns anos antes, cuja implementação se tornou mandatória para todos os Estados Membros (EEA, 2013; 2001). Em qualquer destes casos, as consequências só se tornaram evidentes décadas após as primeiras exposições ocorrerem, devido aos longos períodos de latência dos processos cancerígenos, impedindo a ação no sentido de minimizar ou impedir a exposição. Até que ponto os alertas que foram surgindo nos casos ilustrados poderiam ter conduzido a ações precoces para reduzir os efeitos adversos, a um custo mais baixo para a sociedade, se tivesse sido aplicado o princípio da precaução? Assim, deveremos ter aprendido com estes exemplos e, face ao novo desafio colocado pela crescente produção e utilização de nanomateriais, importará expandir a base do conhecimento através de avaliações integradas que permitam gerar evidência para que os decisores e todas as partes interessadas possam prever as consequências possíveis das ações e inações. Enquanto a incerteza persistir quanto aos potenciais efeitos adversos dos NMs, procura-se que a aplicação do princípio da precaução permita o equilíbrio entre os riscos que possam vir a ser reconhecidos e os benefícios sociais que deles advêm.

Na prática, a aplicação do princípio da precaução implica a implementação de medidas de prevenção baseadas na redução da exposição humana, ao longo de todas as fases do ciclo de vida do NM, tendo em conta as vias de exposição de maior preocupação e incluindo, necessariamente, planos de emergência em caso de acidente. O *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) recomendou o desenvolvimento e implementação de medidas de proteção temporárias no caso da exposição ocupacional (*cit. in* Warshaw, 2012).

Contudo, urge que sejam tomadas decisões regulamentares com base em evidência científica, caso seja identificado algum risco para a saúde humana, pelo que é premente aprofundar os estudos epidemiológicos e toxicológicos sobre NMs. Tratando-se de materiais manufaturados para utilização em produtos de uso humano, tem de ser considerado para esta avaliação o *continuum* da investigação,

desenvolvimento e produção até ao consumidor, bem como todos os seus intervenientes, propondo-se para esse fim o enquadramento ilustrado na Figura 11.

Neste enquadramento, a governança de potenciais riscos para a saúde associados aos NMs deve incorporar estudos de nanotoxicologia e também deve ser adaptativa, à medida que o conhecimento científico progride, de modo a assegurar uma adequada análise do risco em tempo útil, considerando as características específicas dos nanomateriais sem menosprezar os seus grandes benefícios sociais.

4. CURVAS DOSE-RESPOSTA EM ANÁLISE DE RISCO

Um dos elementos-chave para a análise de risco ilustrada na Figura 11 é a identificação de possíveis efeitos adversos dos nanomateriais através da avaliação da relação dose-resposta.

No contexto clássico da toxicologia (Holsapple; Wallace, 2008), presume-se que existe uma relação entre a reação tóxica (ou efeito) e a quantidade de um agente exógeno que o organismo recebeu (dose). Habitualmente, a dose é quantificada através da massa de um químico dissolvido por volume (e.g. g/l), molaridade (número de átomos por volume, mol/ l) ou através da densidade de partículas por volume.

A relação dose-efeito descreve a relação entre a dose de exposição e a intensidade de determinado efeito (Sousa Uva, 2010), enquanto a relação dose-resposta, isto é, a relação entre a dose de exposição e a proporção de indivíduos que apresentam um determinado efeito adverso, permite avaliar a adversidade de um fator de risco (Sousa Uva, 2010), estabelecendo um modelo matemático que a descreve e, através desse modelo, permitindo a definição dos seguintes níveis de dose:

- NOEL, *no observed effect level*, em que não se verifica qualquer efeito
- LOEL, *lowest observed effect level*, nível de dose mais baixa em que se verifica ocorrência de efeito;
- NOAEL, *no observed adverse effect level*, a maior dose em que não se verifica qualquer efeito adverso e
- LOAEL, *lowest observed adverse effect level*, nível de dose mais baixa em que se verifica ocorrência de efeito adverso.

É com base nesses valores que se estabelecem as concentrações admissíveis de cada agente (Uva, 2010). No entanto, deve-se salvaguardar que para alguns agentes (como os cancerígenos ou alergénios) não existe uma dose abaixo da qual não se observa o efeito (que é estocástico), muito embora exista uma relação entre a dose e a probabilidade de ocorrência de efeito.

A função matemática que descreve a dose-efeito é geralmente apresentada na forma de um gráfico com a dose no eixo dos X e o seu efeito no eixo dos Y (Links, J.M., 2006).

A Figura 12 apresenta um exemplo de curva dose-efeito muito comum para vários compostos químicos.

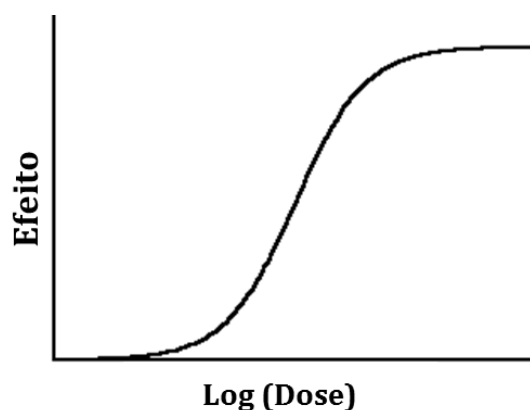


Figura 12. Curva dose-efeito típica, com forma de sigmoide, definida por 4 parâmetros: a linha de base (base), a resposta máxima (topo), o declive e a concentração que induz uma resposta a meio entre a base e o topo (EC_{50}) .

A concentração do agente que provoca uma resposta de 50%, i.e., o valor de EC_{50} , pode ser determinado a partir da curva, tendo em consideração a linha de base, o seu declive (declive de Hill) e a resposta máxima. A determinação de valores de EC_{50} permite a comparação entre a intensidade dos efeitos de vários compostos químicos.

Apesar do comportamento acima descrito ser frequente, as curvas dose-resposta podem ter qualquer outro tipo de forma, sendo o modelo de relação dose-resposta mais simples o modelo linear (ICH, 2009), descrito pela equação:

$$\text{Resposta} = \alpha + \beta \times \text{Dose}$$

onde α é um parâmetro que descreve a resposta média no grupo de controlo (não exposto) e β descreve a média da alteração na resposta por unidade de dose.

Porém, os modelos de relação dose-resposta variam entre modelos simples como este, até modelos extremamente complexos, podendo mesmos ser constituídos por vários modelos ligados entre si.

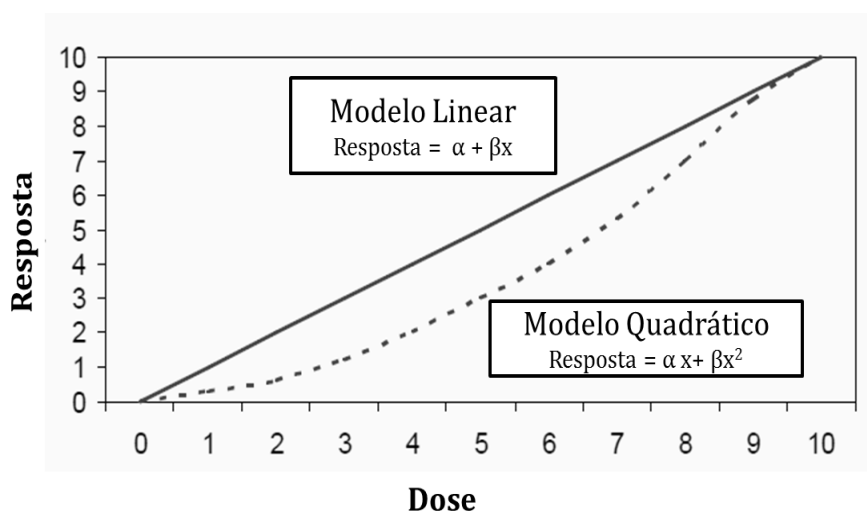


Figura 13. Exemplo de modelos da relação dose-resposta comuns em toxicologia (adaptado de Links, J.M., 2006).

Entre os modelos não lineares podemos encontrar vários tipos de curvas. Nas curvas monotônicas, a direção do efeito não se reverte, i.e., se a curva aumenta com a dose nunca baixa, como na função quadrática acima. No caso de curvas não monotônicas, o declive da curva reverte em algum ponto da curva, como sucede nas curvas dose-resposta em “U” ou em “sino”.

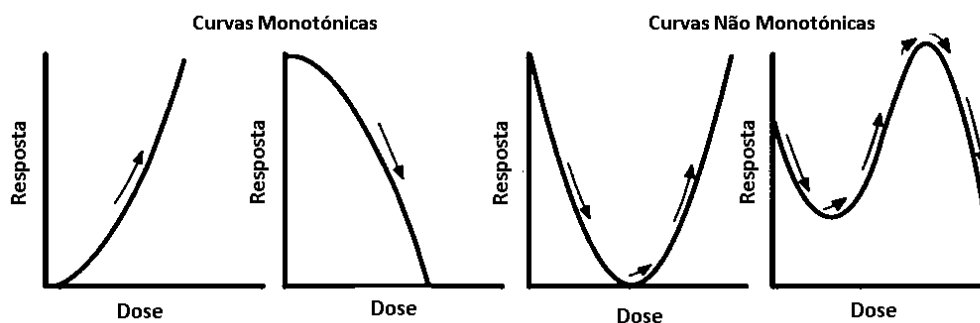


Figura 14. Exemplo de curvas monotônicas e não monotônicas (Fonte: <http://epa.gov/ncct/edr/non-monotonic.html>)

As curvas não monotônicas têm sido atribuídas maioritariamente no que respeita a efeitos de desreguladores endócrinos (Fagin, 2012). No entanto, têm igualmente sido sugeridas em outras situações, tal como no caso de agentes genotóxicos que, em doses elevadas, são citotóxicos ou quando ocorre saturação dos mecanismos de reparação de DNA (exemplos enunciados em (Conolly; Lutz, 2004). Nesse caso, são muitas vezes descritas sob o nome de “hormese”. Assim, este termo

foi atribuído para descrever uma resposta bifásica a um agente exógeno, caracterizada por uma estimulação ou efeito benéfico a baixas doses e um efeito adverso a altas doses (Mattson, 2009).

Uma vez determinado o modelo matemático, são utilizadas ferramentas estatísticas para testar as hipóteses e obter intervalos de confiança para as previsões do modelo.

Deste modo, as curvas dose-resposta constituem uma componente fundamental da análise de risco e da toxicologia regulatória (Holsapple; Wallace, 2008). Uma vez estabelecido um modelo, com base em resultados experimentais *in vitro* ou *in vivo*, procura-se compreender o modo de ação do agente, i.e., a sequência de eventos e processos que conduzem ao efeito adverso (caracterização do risco, Figura 11). Com base no conhecimento do modo de ação, pode então realizar-se a extrapolação para estimar o risco (i.e., probabilidade do efeito adverso) para a saúde humana, recorrendo a modelos lineares ou não lineares (http://www.epa.gov/risk_assessment/dose-response.htm; consulta 21-4-2013).

Também na Nanotoxicologia os conceitos de dose e dose-resposta são elementos essenciais (Simkó, 2012). No entanto, vários autores têm discutido qual a métrica mais adequada para quantificar a dose de um NM, sem conseguir um consenso. A área e a reatividade superficial são consideradas como as quantidades mais importantes em termos de dose (Oberdörster; Oberdörster; Oberdörster, 2007), mas ainda não foi encontrado um consenso relativamente a esta questão. Mais, a dose interna continua a ser uma questão determinante para os efeitos biológicos observados e também a sua forma, como no caso das fibras de asbestos, pode ser relevante. Por sua vez, o comportamento dinâmico dos NMs, possibilitando a aglomeração/agregação ou a ligação a proteínas celulares irão condicionar a dose efetiva que irá atingir as células. Assim, a questão da métrica mais adequada para a dose de NMS nos estudos de toxicologia ainda não se encontra esclarecida (Simkó, 2012).

5. TOXICIDADE DOS NANOMATERIAIS: A NANOTOXICOLOGIA

Datam de 1990 dois trabalhos na revista científica *Journal of Aerosol Science*, que sugeriam a ideia de que as partículas inaladas de diâmetro inferior a 100 nanómetros produziam uma resposta exacerbada nas células pulmonares (Ferin *et al.*, 1990 e Oberdörster *et al.*, 1990, cit. por Maynard; Warheit; Philbert, 2011). A associação entre os efeitos biológicos e a dimensão das partículas, sugerido por estes autores, tem sido progressivamente confirmada através de outros estudos (Maynard; Warheit; Philbert, 2011).

Na Tabela 5 resumem-se as principais características, biocinética e efeitos biológicos das nanopartículas, em comparação com os seus análogos de dimensão superior a 500 nanómetros, que se considera terem maior impacto no seu perfil toxicológico e modo de acção.

Tabela 5. Comparação das características gerais, biocinética e efeitos entre nanopartículas e partículas de dimensões normais, considerando a exposição por via inalatória (adaptado de Oberdörster, 2010).

	Nanopartículas (<100 nm)	Partículas não nano (>500 nm)
Características Gerais:		
Razão número/área superficial por volume	Elevada	Baixa
Aglomeração no ar e líquidos	Provável, depende do meio	Menos provável
Deposição no trato respiratório	Difusão	Sedimentação, captura
Adsorção proteínas/lípidos <i>in vitro</i>	Sim, importante para cinética	Menos efetiva
Translocação para órgãos secundários:		
Células Epiteliais, circulação linfática e sanguínea, sistema nervoso	Sim	Não, só em condições de sobrecarga
Mucociliaridade	Provável	Eficiente
Fagocitose por Macrófagos	Baixa	Eficiente
Internalização nas células:		
-mitocôndrias	Sim	Sobretudo células fagocitárias
-núcleos	Sim	Não
	Provável (<40 nm)	Não
Efeitos Diretos (dependendo da dose):		
Na via de entrada (trato respiratório)	Sim	Sim
Em órgãos-alvo secundários	Sim	Não
Inflamação, stresse oxidativo, ativação de vias de sinalização	Sim	Sim

Em consequência, a previsão do comportamento e consequências dos NMs em meio fisiológico envolve um cenário de interações complexas entre os NMs e os

constituintes biológicos. Algumas das interações possíveis são ilustradas na Figura 15, para o caso dos NMs inorgânicos:

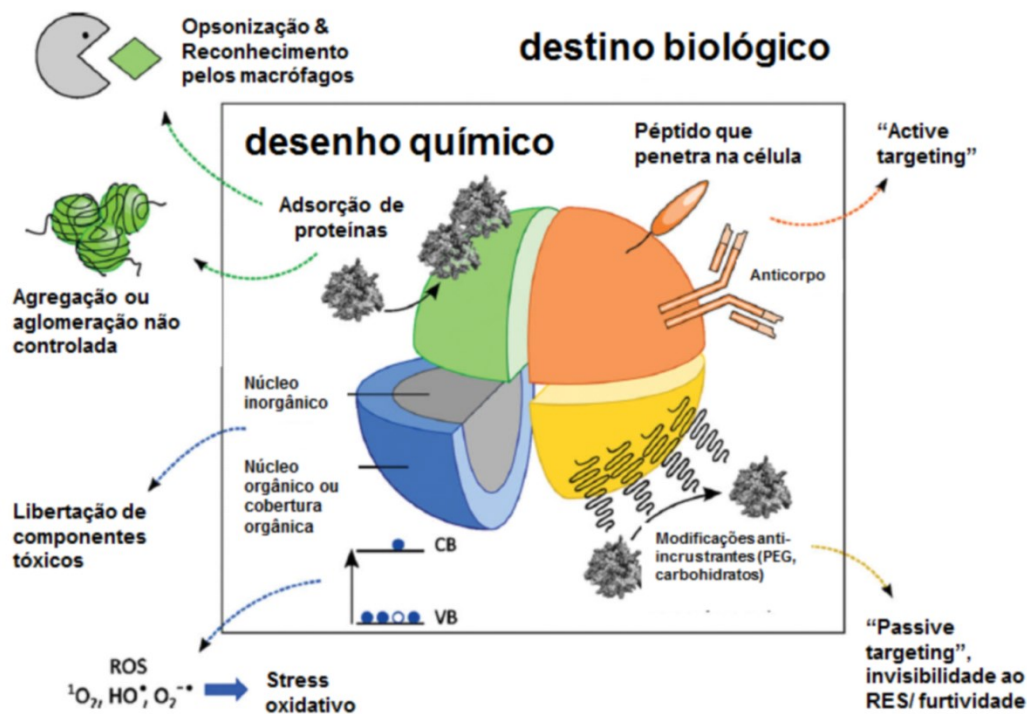


Figura 15. Representação esquemática do destino biológico dos NMs em meio fisiológico, de acordo com o seu desenho químico. O cenário a verde ilustra alguns potenciais efeitos adversos após adsorção por proteínas; a laranja representa-se a funcionalização dos NMs com péptidos que penetram nas células ou anticorpos; o amarelo ilustra a possibilidade de facilitar o transporte passivo com modificações de superfície adequadas; o cenário a azul representa os efeitos adversos como a dissolução dos NMs e a produção de ROS. RES - sistema reticuloendotelial. (Adaptado de Pelaz *et al.*, 2012)

Em contacto com fluidos biológicos, os NM podem ser revestidas por proteínas (formando uma estrutura específica, a “corona”) ou ligarem-se a outras biomoléculas.

Acresce a esta complexidade de interações o facto de que muitos NMs são insolúveis, pelo que a sua preparação em meio líquido, frequentemente necessária aos ensaios toxicológicos, envolve a sua dispersão em lugar de solubilização (OECD, 2012). Assim, o termo “dispersão” é utilizado em vez de “solução”, considerando que nas preparações dos NMs a fase sólida e líquida coexistem, embora as pequenas dimensões dos NMs dificultem a distinção entre dispersão e dissolução (OECD, 2012). Nas dispersões os NMs podem existir como partículas primárias, agregados ou aglomerados (Figura 3), sendo a estabilidade da dispersão condicionada pelo equilíbrio das forças químicas existentes, por sua vez condicionado pelo meio de dispersão e pelas suas propriedades de superfície. Assim, os resultados de um ensaio

toxicológico para NMs aglomerados, pode diferir do resultado para dispersões estáveis (OECD, 2012). Processos como a ultrasonicação podem contribuir para a desaglomeração dos NMs e a presença de estabilizadores no meio permite prolongar este efeito. Considerando estes aspetos, a preparação das amostras de NMs para utilização em ensaios biológicos tem de ser criteriosamente controlada para permitir a sua adequada interpretação.

Assim, as propriedades dos NMs tais como hidrofobicidade, funcionalização, carga superficial, estado de dispersão e adsorção de proteínas na sua superfície são determinantes para a sua absorção, metabolização e eliminação ou acumulação no organismo (Zhu *et al.*, 2012). Estas propriedades podem, no entanto, ser modificadas de um modo dinâmico quando em condições biológicas ou ambientais distintas. Por este motivo, mesmo quando o perfil toxicológico dos constituintes de um NM é conhecido, podem existir casos em que os seus efeitos na saúde e no ambiente sejam distintos relativamente aos dos mesmos constituintes na forma não nanométrica.

Sucede que à data, grande parte dos trabalhos publicados sobre nanotoxicologia não descreve adequadamente a caracterização físico-química dos NMs testados, tais como, tamanho, forma, composição química, cristalinidade e propriedades de superfície (e.g., área, porosidade, carga, funcionalização) que condicionam fortemente a sua cinética e atividade biológica. Para além disso, aspetos relacionados com o procedimento experimental, tais como o método de preparação e controlo de dispersões dos NMs, as condições de exposição, a falta de controlos positivos e a utilização de metodologias ainda não standardizadas, podem ser determinantes nos resultados obtidos. Por exemplo, a agregação dos NMs pode condicionar mecanismos como a eliminação efetiva das partículas maiores pelos macrófagos. Muitos estudos são conduzidos em intervalos de concentrações muito elevadas, favorecendo a agregação e, conseqüentemente, reduzindo a sua potencial toxicidade (Oberdörster, 2010). Por isso, em muitos dos estudos poderão não ser detetados efeitos mais subtis que podem ocorrer a baixas concentrações, com risco para a saúde humana, como é o caso da indução de lesões no DNA em células somáticas ou em células germinais, que podem contribuir a longo prazo para, respetivamente, o desenvolvimento de um processo cancerígeno ou para o aparecimento de doenças hereditárias na descendência.

Segundo o *Joint Research Center* (JRC), a avaliação de segurança dos nanomateriais deve ser enquadrada ao nível da investigação básica e translacional, procurando produzir-se conhecimento sobre os mecanismos de toxicidade específicos dos NMs e aplicar esse conhecimento para reduzir os seus impactos na saúde (JRC,

2011a). Assim, sugere o desenvolvimento de metodologias inovadoras para análise de riscos nanoespecíficos e a validação de modelos *in vitro* e *in vivo* recorrendo a NMs de referência (JRC, 2011a).

Por outro lado, os muitos esforços internacionais realizados têm vindo a produzir uma grande quantidade de dados sobre a toxicidade das diversas classes de NMs, sendo de estimular também a adequada partilha e difusão do conhecimento, incluindo a apresentação de resultados negativos, e a realização de meta-análises de toda esta a informação (Hankin *et al.*, 2011). Por fim, preconiza-se como prioridades de investigação a definição de curvas dose-resposta em órgãos alvo e sistemas complexos, recorrendo a materiais bem caracterizados (JRC, 2011a).

Por outro lado, os pareceres emitidos pelo Comité Científico para os Riscos Emergentes e Identificados de novo (*Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks*, SCENIHR, 2010) e pela UE destacam as nanopartículas livres e os NMs de baixa solubilidade como uma preocupação prioritária no contexto do risco humano e ambiental.

Perante esta necessidade de conhecimento, tem-se assistido a uma conjugação de esforços de organismos internacionais, como o Centro para o Controlo de Doenças (*Center for Disease Control*, CDC), a OECD e a UE, no sentido de promover projetos e grupos de trabalho com vista a assegurar a utilização segura dos NMs. Neste contexto, a Nanotoxicologia - visando a avaliação dos efeitos adversos dos NMs no organismo humano e ecossistemas, levando em consideração as especificidades destes, para proteger a saúde - tem vindo a desenvolver-se como uma área de relevo no âmbito da saúde pública (Oberdörster, 2010). Esta área recente da toxicologia deverá produzir o conhecimento científico dos mecanismos de ação dos NMs nos sistemas biológicos, que contribuirá para a realização de uma análise de risco, em contexto de saúde pública, conforme se propõe esquematicamente na Figura 11.

A nanotoxicologia poderá ainda contribuir para uma abordagem preditiva, que vem ao encontro da abordagem proposta por Nel *et al.* (2013). De acordo com este autor, a necessidade de uma plataforma para a investigação das interações na interface nano/bio, pode ser respondida através de metodologias com elevado rendimento (*High-Throughput Screening*) para o rastreio *in vitro* das propriedades toxicológicas dos NMs, fundamentadas no seu modo de ação, procurando prever-se quais as propriedades físico-químicas dos NMs que podem conduzir a patologias *in vivo* (e.g. Nel *et al.*, 2013). Espera-se que a utilização deste tipo de nanotoxicologia preditiva permita, futuramente, estabelecer uma abordagem de *safe-by-design* (JRC,

2011) que pressupõe a síntese de NMs seguros após modificação das propriedades responsáveis pela sua toxicidade. Para isso, é essencial conhecer o seu modo de ação bem como as propriedades diretamente associadas à sua toxicidade, para que se possam modificar, minimizando os efeitos tóxicos e promovendo a síntese de NMs seguros, que terão, ainda assim, de ser analisados quanto à sua segurança.

6. POTENCIAIS EFEITOS ADVERSOS DOS NANOMATERIAIS MANUFATURADOS

6.1. Efeitos na saúde humana

Muitos dos possíveis efeitos da exposição a NMs na saúde humana foram sugeridos por estudos epidemiológicos em indivíduos expostos a nanomateriais produzidos como consequência dos processos e atividades humanas e da poluição (revistos em Pietroiusti, 2012). Os potenciais efeitos adversos dos NMs e as linhas de evidência que os sugeriram resumem-se na tabela seguinte.

Tabela 6. Potenciais efeitos adversos dos NMs e as evidências científicas que os sugerem (com base em Pietroiusti, 2012).

Possíveis efeitos adversos dos NMs	Linha de Evidência
Sistema respiratório <ul style="list-style-type: none">- pneumonia- fibrose- formação de granuloma- proteinose alveolar- lesões pleurais	Estudos epidemiológicos em humanos expostos a nanomateriais produzidos como consequência da atividade humana e da poluição.
Pele: <ul style="list-style-type: none">- inflamação,- tumores benignos cutâneos- granulomas	Estudos <i>in vitro</i> .
Sistema Cardiovascular: <ul style="list-style-type: none">- aterosclerose- arritmias cardíacas	Estudos epidemiológicos têm sugerido que os nanomateriais são o componente mais importante nas lesões do sistema cardiovascular relacionadas com a poluição do ar. Evidências <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i> .
Sistema Nervoso Central: <ul style="list-style-type: none">- ruptura da barreira sangue-cérebro hemato-encefálica- inflamação	Estudos relacionados com a exposição a nanomateriais da poluição do ar. Evidências <i>in vivo</i> .
Sistema Reprodutor: <ul style="list-style-type: none">- redução de fertilidade- toxicidade no desenvolvimento fetal	Alguns (poucos) estudos <i>in vivo</i> .
Efeitos Sistêmicos <ul style="list-style-type: none">- genotoxicidade- imunotoxicidade	Evidência <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> não conclusiva.

Alguns “case reports” (revistos em NIOSH, 2011) descrevem, por exemplo, a retenção de titânio nos pulmões de trabalhadores expostos a TiO_2 respirável, verificando-se uma resposta local dos macrófagos com fibrose moderada, mas de gravidade variável, no local da deposição. No entanto, em relação a este tipo de NMs, existem também alguns estudos epidemiológicos (descritos na secção 7) que não indiciam efeitos adversos do TiO_2 (NIOSH, 2011).

Assim, os efeitos adversos respiratórios dos NMs incluem granulomas multifocais, inflamação peribrônquica, fibrose intersticial progressiva, deposição de colagénio e resposta inflamatória crónica (revistos por Ferreira; Cemlyn-Jones; Cordeiro; 2013). A resposta inflamatória, que tem como consequência a produção de radicais livres de oxigénio (ROS) e de azoto é, de facto, a via mais evidente que correlaciona a exposição a NMs com a ocorrência de lesões nos tecidos (revisto em Pietroiusti, 2012). É possível que, ao causar lesões no genoma das células, os NMs tenham o potencial de contribuir para o desenvolvimento de neoplasias. De facto, este tipo de resposta dos tecidos quando em contacto com NMs, particularmente no caso dos nanotubos de carbono, tem levado ao estabelecimento de analogias com os conhecidos casos da silicose e asbestose em que a inflamação crónica pode conduzir a genotoxicidade, mutações, morte celular e cancro (Jacobsen *et al.*, 2008). A estrutura fibrosa de alguns NMs, semelhante a asbestos, acentua esta analogia. Diversos outros estudos que têm investigado as consequências da exposição aos NMs por inalação em roedores, relativamente à ocorrência de lesões nos pulmões, inflamação e formação de tumores, não foram conclusivos quanto à indução de mesotelioma mas foram visíveis lesões nos pulmões de várias espécies (revisto por Handy; Shawn, 2007).

Considerando os potenciais efeitos adversos referidos na Tabela 6, globalmente tem sido confirmado o potencial tóxico dos NMs e podem inferir-se uma variedade de patologias do sistema respiratório, pele, etc., possivelmente associadas à exposição aos NMs. Porém, até à data não existem estudos epidemiológicos conclusivos sobre a existência de efeitos adversos dos nanomateriais manufacturados, pelo que ainda não existe evidência inequívoca sobre a sua toxicidade.

6.2. Possíveis mecanismos para os efeitos carcinogénicos dos nanomateriais

Uma das principais preocupações relativamente aos efeitos adversos dos NMs na saúde humana é o seu potencial efeito carcinogénico que importa avaliar e caracterizar. A reduzida dimensão dos NMs conduz a uma maior deposição destes nas vias respiratórias (revisto por Andujar *et al.*, 2011) onde podem ser responsáveis por efeitos citológicos nocivos. Em situações de inflamação crónica, a produção de ROS causando stresse oxidativo a nível celular, por sua vez, pode causar alterações no genoma das células adjacentes, produzindo efeitos genotóxicos secundários (Figura 16). A consequente acumulação de alterações genéticas poderá facilitar o processo de transformação das células em direção a um fenótipo maligno.

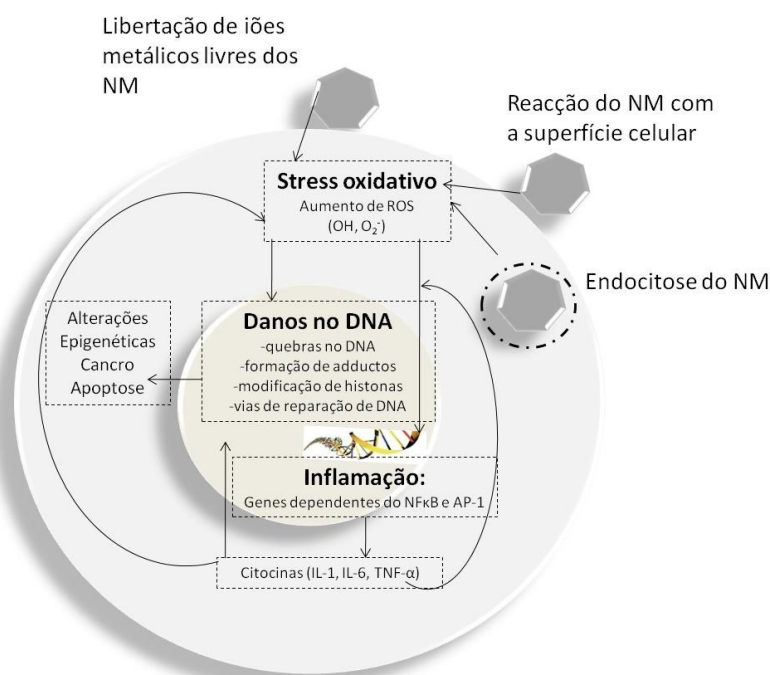


Figura 16. Mecanismos indirectos que podem conduzir à genotoxicidade pelos NM (adaptado de Singh *et al.*, 2009).

Contudo, mesmo na ausência de uma resposta inflamatória, os NMs podem induzir, primariamente, efeitos genotóxicos mediados por stresse oxidativo, através da sua interação com constituintes celulares, incluindo as mitocôndrias e oxidases NADPH ligadas à membrana celular ou através da depleção de antioxidantes, (e.g., glutationo). Sabe-se, por exemplo, que os iões metálicos de transição contidos na composição de muitos NMs (e.g., cádmio, crómio, cobalto, cobre, ferro, níquel, titânio

e zinco) podem ser libertados, causando a conversão dos metabólitos do oxigênio celular em ROS (Singh *et al.*, 2009). Jacobsen *et al.* (2008) demonstraram a indução de ROS em células expostas a negro de carbono, nanotubos de carbono de parede simples e fulerenos C₆₀. Até que ponto, na situação de exposição por via inalatória a NMs, este tipo de mecanismo de transformação celular pode ser generalizado, ainda permanece uma questão em aberto que deverá ser objeto de investigação futura.

Para além das lesões oxidativas no DNA, também os efeitos genotóxicos diretos dos NMs podem contribuir de forma determinante para gerar instabilidade genética que, por sua vez, pode contribuir para o desenvolvimento de processos cancerígenos. Teoricamente, a capacidade de penetração dos NMs nos sistemas celulares será superior à dos seus análogos não nanométricos, permitindo-lhe atravessar as membranas celulares e atingir o núcleo, onde poderão interagir diretamente com o genoma da célula ou com as proteínas nucleares. Os NMs que não consigam transpor a membrana nuclear poderão, ainda assim, ter acesso ao DNA e proteínas nucleares no decurso do processo mitótico, podendo originar fenómenos de aneuploidia. Este tipo de acontecimentos foi já descrito para os NMs de dióxido de titânio e sílica que penetram no núcleo e causam a formação de agregados de proteínas intranucleares, levando à inibição da replicação, transcrição e proliferação celular (revisto em Singh *et al.*, 2009). Estudos mais recentes sugerem que o dióxido de titânio é capaz de se inserir também nas bases de DNA, ligando-se aos nucleótidos e alterando a estrutura secundária do DNA (Li *et al.*, 2010). Outro exemplo diz respeito às nanopartículas de ouro que parecem exibir a capacidade de se ligarem ao DNA, quer exteriormente, quer intercalando-se parcialmente na cadeia de DNA (Biver *et al.*, 2011). Apesar destes efeitos observados, outros estudos, porém, têm revelado resultados negativos para as mesmas classes de NMs.

Embora os mecanismos descritos, consistindo numa ação primária direta ou indireta dos NMs sobre o genoma ou numa ação secundária, via resposta inflamatória (Figura 15), tenham vindo a ser propostos com base em evidências experimentais, ainda persistem muitas incertezas que justificam uma intensificação dos estudos sobre os potenciais efeitos adversos destes materiais com vista a uma correta avaliação de risco.

Contudo, os ensaios de carcinogénese são demorados (cerca de 2 anos) e muito dispendiosos, uma vez que se baseiam na exposição de um elevado número de animais ao agente em estudo e na observação do estado de saúde ao longo da sua vida, com vista à deteção da eventual formação de tumores. As lesões no material genético são geralmente consideradas como um biomarcador do risco de cancro

(Hoeijmakers, 2001) dada a relação entre exposição a determinados compostos químicos e carcinogénese bem estabelecida em humanos. Os ensaios de genotoxicidade são, assim, utilizados como preditivos de um potencial efeito carcinogénico.

Após lesões no DNA, é desencadeada uma rede complexa de funções de sinalização e reparação (Figura 17) para repor a estabilidade genética ou eliminar a célula lesada.

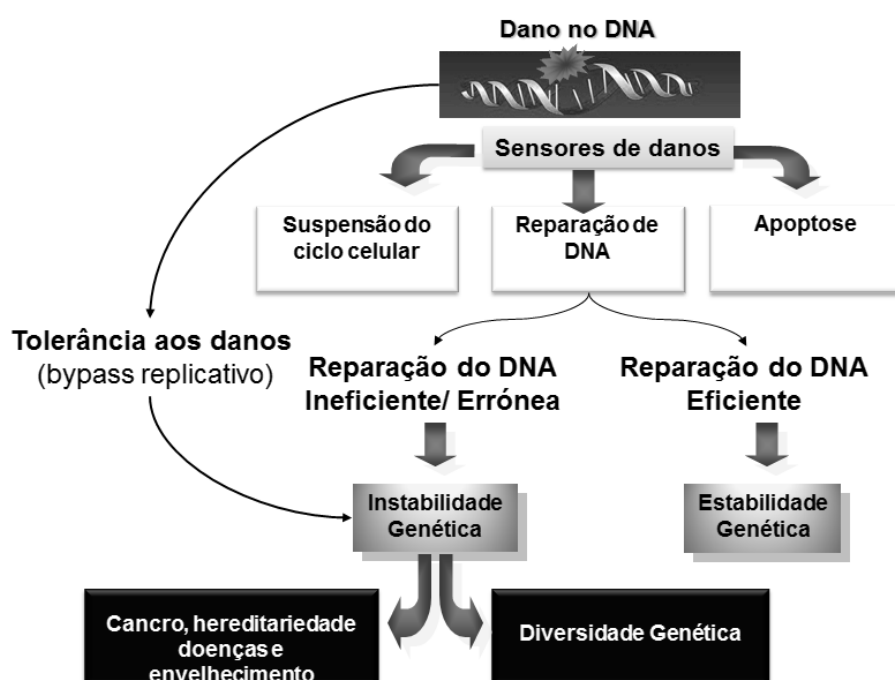


Figura 17. A relação complexa entre genotoxicidade e o aparecimento de cancro (Louro; Silva, 2011).

Logo depois da deteção da lesão no DNA, a sinalização e remodelação da cromatina ativam os pontos de verificação do ciclo celular, morte celular programada e/ou vias de reparação de DNA que procuram restaurar a sequência de DNA original. Se a estabilidade genética não for reposta, os danos podem conduzir a doenças genéticas como o cancro ou, alternativamente, gerar diversidade genética que contribui para a evolução (Louro; Silva, 2011). Assim, a investigação da cadeia de acontecimentos moleculares que conduz desde a lesão no DNA ao resultado biológico, incluindo a expressão diferencial de genes, é fundamental para identificar e prevenir riscos decorrentes da utilização de novos agentes químicos que possam contribuir para o aparecimento de doença. Esta última abordagem, da análise de

alteração de expressão de genes em resposta a estímulos ambientais, ou efeito toxicogenômico, constitui uma abordagem recente aos mecanismos de genotoxicidade (Aubrecht; Caba, 2005). Esses podem ser aferidos através de estudos de transcriptômica ou de análise de proteínas (Gou; Gu, 2011; National Academy of Sciences, 2007). Por exemplo, a exposição prenatal de ratinhos a NM de negro de carbono revelou alterações na expressão de genes das vias metabólicas (Jackson *et al.*, 2011) e a exposição de linhas celulares a NM de prata modificou a expressão de genes relacionados com citoesqueleto, membrana celular, metabolismo de energia e vias de reparação de DNA (Ma; Lü; Huang, 2011). Assim, um possível mecanismo de genotoxicidade dos NM poderia envolver a diminuição da expressão de genes envolvidos nas vias de reparação de DNA.

6.3. Ensaios de genotoxicidade e sua aplicação aos nanomateriais

Os estudos experimentais sobre genotoxicidade subdividem-se em duas grandes categorias, ambas relevantes para a saúde humana. Os estudos *in vitro* incluem investigação em células, que podem ter sido isoladas de animais ou humanos ou consistir numa linha celular imortalizada (Maurer-Jones; Haynes, 2012). Como referem estes autores, entre estas duas situações, é preferível a utilização de células primárias isoladas diretamente do organismo, uma vez que as células imortalizadas se transformam ao longo do tempo. No entanto, estas são muitas vezes mais simples de obter. Por sua vez os estudos *in vivo* envolvem organismos complexos que são expostos aos agentes através de administração por via inalatória, dérmica, oral ou injeção (Maurer-Jones; Haynes, 2012).

Os ensaios de genotoxicidade *in vitro* possuem grandes vantagens em relação aos ensaios realizados *in vivo* (revistas em Stone *et al.*, 2009). Em primeiro lugar, constituem alternativas aos ensaios em animais, de acordo com as recomendações éticas e as indicações internacionais (EU, 2010). São geralmente ensaios relativamente simples, rápidos e menos dispendiosos, permitindo por vezes obter alguma informação sobre os mecanismos associados aos efeitos observados (Stone *et al.*, 2009). No entanto, os sistemas *in vitro* não permitem mimetizar toda a

complexidade de um organismo, com a diversidade de interações entre os vários tipos celulares, órgãos e tecidos ou as barreiras biológicas, que influenciam o resultado da exposição a agentes exógenos (Louro; Silva, 2010).

Os ensaios *in vivo* são especialmente informativos uma vez que a resposta é condicionada pelo metabolismo *in vivo*, toxicocinética, processos de reparação de DNA, tolerância ao dano (OECD, 2011), sendo também mais facilmente extrapoláveis para a saúde humana. Na realidade, os ensaios *in vitro* estão restritos a observações ao nível molecular e celular, enquanto os estudos *in vivo* consideram os vários níveis de complexidade inerentes à resposta integrada de um organismo completo, que influencia o resultado da exposição a agentes exógenos (Figura 18). Outros níveis de complexidade supra-organismais, como sendo o ambiente e as comunidades também contribuem para o resultado da exposição a agentes genotóxicos e são englobados quando utilizando ensaios *in vivo*.

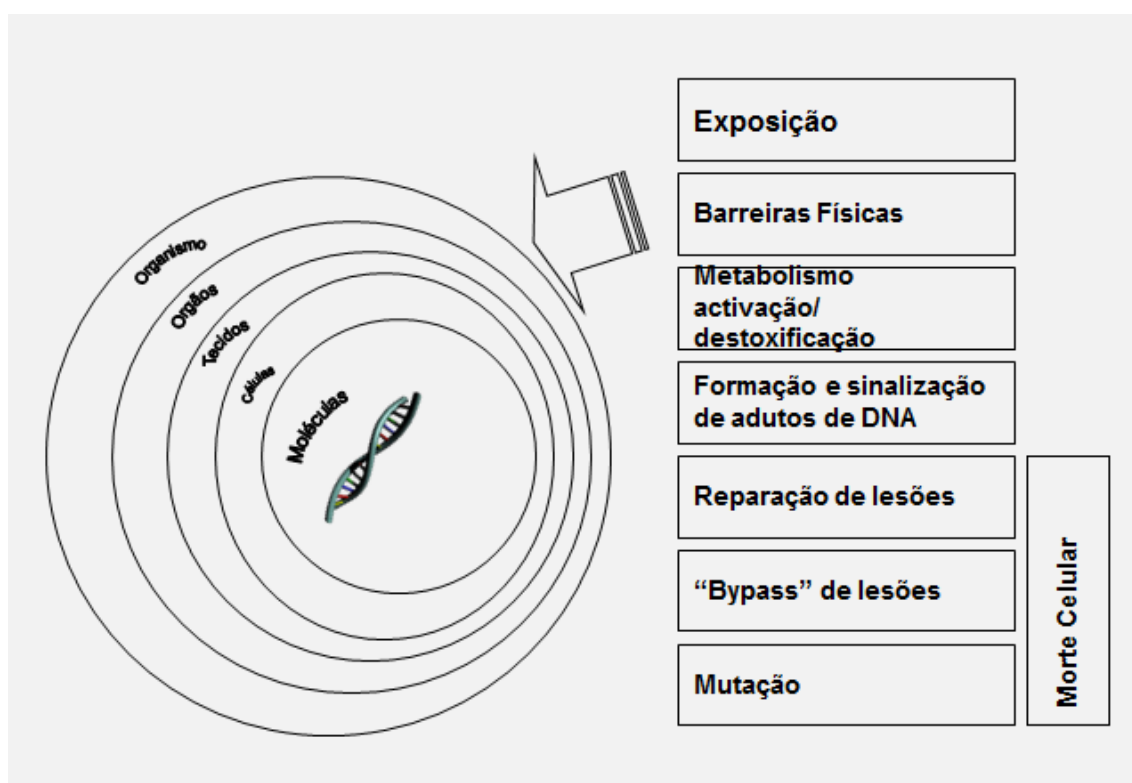


Figura 18. Complexidade que afeta o resultado da exposição a agentes genotóxicos *in vivo* (adaptado de Louro; Silva, 2011).

Alguns autores têm sugerido que os ensaios *in vivo* são especialmente importantes para avaliar o desempenho (ainda discutível) dos ensaios *in vitro* na caracterização da genotoxicidade dos NMs (Lindberg *et al.*, 2012).

Por sua vez, o estabelecimento de correlação entre os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo* poderá contribuir para delinear estratégias de avaliação da genotoxicidade mais expeditas para os NMs, permitindo um “screening” mais eficaz para a multiplicidade de NMs já em utilização.

Presentemente a avaliação da segurança da maior parte dos xenobióticos no que se refere ao seu efeito genotóxico, é geralmente baseada numa combinação de ensaios que permitem avaliar três tipos de alterações genéticas com particular relevância na determinação de cancro: mutação génica, clastogenicidade (quebra cromossómica) e aneuploidia (perda cromossómica).

Tabela 7. As duas opções de testes adequados para avaliação do potencial mutagénico/carcinogénico de novos produtos farmacêuticos (EMA, 2008) e respectivas orientações da OCDE (Warheit; Donner, 2010).

Opção 1	<p>i) um teste para deteção de mutação génica em bactérias (e.g. teste de Ames)- OECD TG471.</p> <p>ii) um teste <i>in vitro</i> para avaliação de anomalias cromossómicas em células de mamífero (e.g. micronúcleos) <u>OU</u> um ensaio <i>in vitro</i> de mutação génica em células somáticas de mamífero (e.g. análise de mutações no gene <i>hprt</i> em células CHO) - OECD TG473 ou OECD TG476.</p> <p>iii) um teste <i>in vivo</i> para análise de efeitos cromossómicos em células hematopoiéticas de roedor (e.g. micronúcleos em medula óssea de ratinho ou em reticulócitos de sangue periférico)- OECD TG475, OECD TG474, OECD TG486.</p>
Opção 2	<p>i) um teste para deteção de mutação génica em bactérias (e.g. teste de Ames)- OECD TG471.</p> <p>ii) um teste de genotoxicidade <i>in vivo</i>, em 2 tecidos, habitualmente um ensaio de micronúcleos em células hematopoéticas de roedor e um segundo ensaio <i>in vivo</i>.- OECD TG474 ou OECD TG488.</p>

Dado que um único teste é insuficiente para caracterizar estes três eventos-chave, têm sido propostas várias abordagens baseadas na combinação de testes de genotoxicidade de curto-termo *in vitro* e *in vivo*, conforme preconizado na revisão das linhas orientadoras elaboradas pelo grupo de trabalho da *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH; EMA 1996; 1998) e, mais recentemente, da Organização Mundial de Saúde/ Programa Internacional de Segurança Química (OMS/IPCS; Eastmond *et*

al., 2009). Ensaios deste tipo têm vindo a ser realizados no Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) com vista à caracterização de efeitos genotóxicos de agentes físicos, químicos e biológicos e seus mecanismos de ação a nível molecular, celular e do organismo.

Para a avaliação de anomalias cromossómicas em células de mamífero (*in vitro*) é frequentemente utilizado o ensaio do micronúcleo (Figura 19). Os micronúcleos são estruturas que têm a sua origem em fragmentos de cromossomas (acontecimentos clastogénicos) ou cromossomas inteiros (acontecimentos aneugénicos) que, devido a quebras na dupla cadeia de DNA, se perdem durante a divisão nuclear (Fenech, 2007). Os micronúcleos correspondem assim a fragmentos de cromossomas, de coloração idêntica ao núcleo da célula, e podem ser visualizados em microscopia por exemplo após o bloqueio da citocinese nas células em cultura, retendo-as na fase binucleada anterior à citocinese (Fenech *et al.*, 2011). Também podem ser observadas outras formações anómalas, como as pontes nucleoplásmicas, indicadores de reparação errónea de DNA e/ou de fusões dos terminais dos telómeros, ou ainda as vesículas (“buds”) nucleares, que são um biomarcador da eliminação do DNA amplificado e/ou complexos de reparação de DNA (Fenech, 2007).

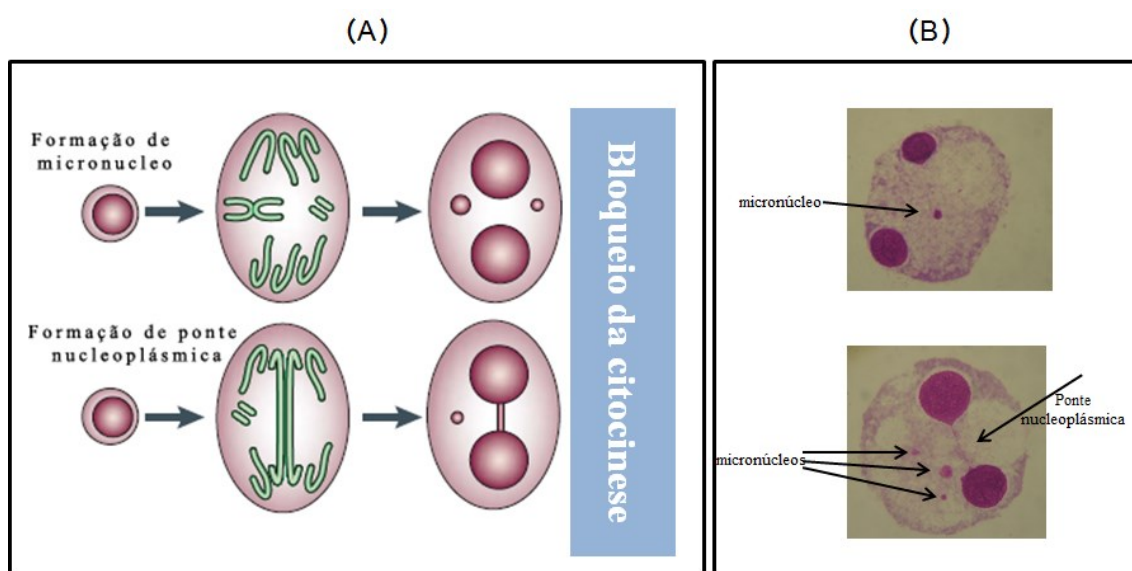


Figura 19. (A) Formação de micronúcleos e ponte nucleoplásmica durante a divisão celular (Fenech, 2007); (B) Microfotografia de células de adeno carcinoma humano (A549) após bloqueio da citocinese utilizando citocalasina B, apresentando micronúcleos e ponte nucleoplásmica.

Assim, os micronúcleos, as pontes nucleoplásmicas e as vesículas nucleares são biomarcadores de acontecimentos genotóxicos e de instabilidade cromossômica (Fenech *et al.*, 2011). A sua frequência pode ser quantificada num conjunto de células expostas a um agente genotóxico e, comparando este valor com o obtido para células não expostas, verifica-se se há ou não alteração devida à exposição. Esta metodologia fornece ainda informação sobre a progressão do ciclo celular através da proporção relativa de células mononucleadas, binucleadas e multinucleadas e sobre citotoxicidade, através da razão de células necróticas ou apoptóticas (Fenech, 2007).

O ensaio do micronúcleo *in vitro* em células de mamífero ou em linfócitos humanos é um método aceite e validado para efeitos regulatórios, de acordo com a orientação 487 da OECD (OECD, 2010). Permite a realização de estudos de biomonitorização em humanos expostos a agentes potencialmente genotóxicos e pode ainda ser utilizado *in vivo* para análise de efeitos cromossômicos em células hematopoiéticas de roedor, como em eritrócitos de medula óssea de ratinho ou em reticulócitos de sangue periférico, em conformidade com a orientação 474 da OECD (OECD, 1997). Neste último caso, a Figura 20 ilustra o processo de maturação de um eritoblasto da medula óssea em eritrócito policromático, durante o qual o núcleo é eliminado e os micronúcleos formados podem persistir no citoplasma.

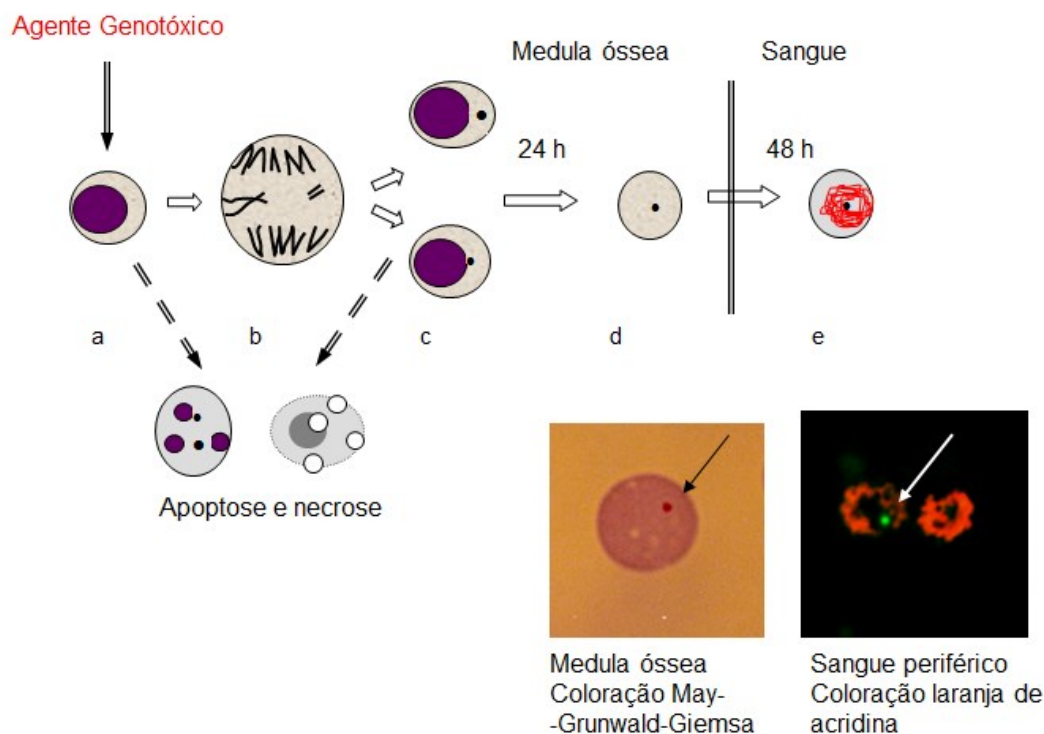


Figura 20. O ensaio do micronúcleo *in vivo* em células hematopoiéticas de roedor (adaptado de Fenech, 2003).

No caso do sangue de ratinhos, verifica-se que durante o processo de maturação dos eritrócitos, os núcleos são excluídos mas os micronúcleos persistem nos reticulócitos. Assim, a visualização dos micronúcleos nestas células é facilitada devido à ausência de núcleo. Os reticulócitos (RETs), que se distinguem pelo seu tamanho maior e pelo elevado conteúdo de RNA, eventualmente entram na circulação sanguínea e tornam-se eritrócitos maduros, com ou sem micronúcleos (Fenech, 2003). A observação de um aumento da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados nos animais expostos é uma indicação da indução de danos nos cromossomas (OECD, 1997).

Uma vez que considera factores como o metabolismo de um organismo complexo, reparação de DNA e toxicocinética, o ensaio do micronúcleo *in vivo* é um ensaio particularmente interessante. Para além disso, a correlação entre a frequência elevada de micronúcleos em linfócitos de sangue periférico e a ocorrência de cancro foi demonstrada em diversos estudos epidemiológicos (revistos em Bonassi *et al.*, 2011) o que levou a que este biomarcador fosse geralmente aceite como indicador do risco de cancro. No entanto, este ensaio pode revelar-se irrelevante se existirem evidências de que o agente em estudo não atinge a medula óssea.

De acordo com as orientações da OECD, existe a necessidade de incluir entre os testes de genotoxicidade um sistema *in vivo* que permita a deteção de mutações génicas, uma vez que a maioria dos testes aplicáveis *in vivo* (como o do micronúcleo) apenas consegue detectar lesões cromossómicas (OECD, 2011). Para além de estarem relacionadas causalmente com a indução de cancro, as mutações génicas também contribuem de modo determinante para o envelhecimento e para doenças hereditárias. Assim, a determinação de mutações génicas *in vivo* é considerada como um teste confirmatório, que pode contribuir para a evidência científica, quando se obtiveram resultados equívocos *in vitro* ou *in vivo* (ICH, 2012).

Os modelos de murganhos (ratinhos) transgénicos têm sido reconhecidos como ferramentas valiosas para contribuir para a identificação e caracterização de perigos, assegurando a análise de riscos para a saúde humana (Boverhof *et al.*, 2011). As vantagens e desvantagens destes modelos para ensaios de mutações são enunciadas na Tabela 8.

Tabela 8. Principais vantagens e desvantagens dos ensaios de mutações com ratinhos transgênicos (baseado em OECD, 2009).

<i>Vantagens</i>	<i>Desvantagens</i>
<ul style="list-style-type: none"> - <i>Análise de diversos tecidos</i> As mutações podem ser analisadas em qualquer tecido de onde se obtenha DNA genómico de elevado peso molecular, incluindo células germinais ou somáticas. - <i>Capacidade de deteção de mutações pontuais</i> - <i>Facilidade de análise molecular do tipo de mutações, opcional.</i> - <i>Vias de administração flexíveis</i> O agente a testar pode ser administrado por qualquer via. - <i>Reduzidas limitações à sua aplicabilidade</i> Pode ser realizada a avaliação de mutações que surjam em virtualmente todos os tecidos e em qualquer estadio do desenvolvimento. - <i>Reprodutibilidade de resultados</i> A reprodutibilidade dentro do mesmo laboratório e entre laboratórios diferentes é elevada. - <i>Redução do número de animais</i> Utilizam um número de animais muito menor que os modelos de mutação em genes endógenos. - <i>Versatilidade</i> Possibilidade de combinar análises integradas no mesmo animal. 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Elevada frequência de mutantes espontâneos</i> Valor superior ao dos genes endógenos e que aumenta com a idade do ratinho. - <i>Custo elevado</i> Os custos com ensaios em ratinhos transgênicos são muito superiores aos de outros ensaios de genotoxicidade e requerem pessoal técnico bem treinado. - <i>Ausência de automatização dos procedimentos experimentais.</i>

Entre os modelos de ratinhos transgênicos para análise de mutações, o modelo baseado em plasmídeo contendo o gene bacteriano *LacZ* (Boerrigter *et al.*, 1995) revela grande utilidade para determinar mutações em múltiplos órgãos. De facto, este modelo animal é utilizado no INSA há muitos anos, tendo sido utilizado para a caracterização de mutações induzidas por compostos químicos (Louro *et al.*, 2002) e para a investigação dos mecanismos de genotoxicidade e influência das vias de reparação de DNA nas lesões genéticas (Louro *et al.*, 2008; 2010).

O ratinho transgénico baseado em plasmídeo possui inserido no seu genoma, nos cromossomas 3 e 4, concatêmeros contendo múltiplas cópias do plasmídeo pUR288 (Figura 21).

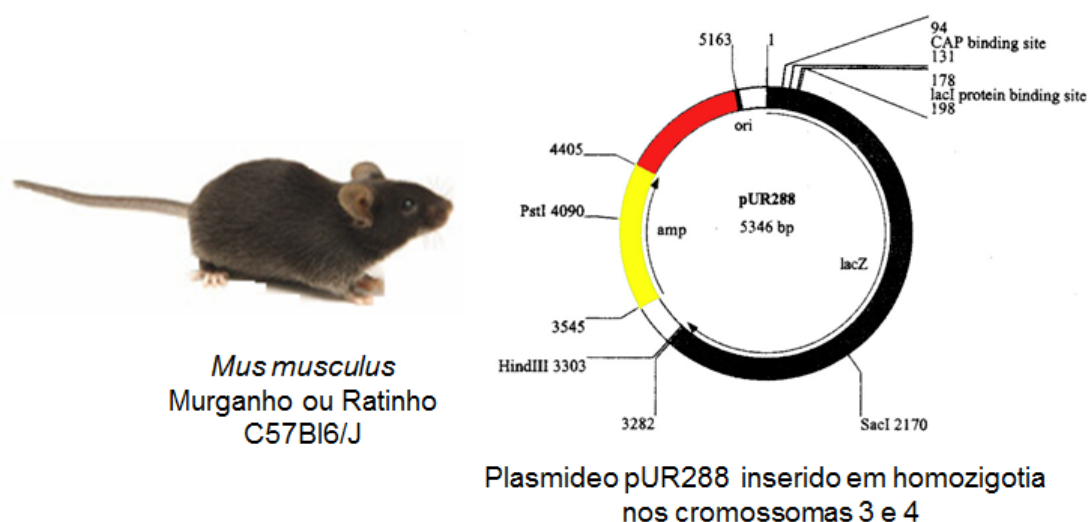


Figura 21. O modelo de ratinho transgénico baseado em plasmídeo contendo o gene *LacZ*. *amp^R* gene de resistência à ampicilina; ori- origem de replicação; lacI protein binding site- sequência operadora do operão Lac (O); *LacZ*- gene codificante da β -galactosidase de *E.coli*.

Com um comprimento de 5346 pares de base, o plasmídeo pUR288 foi construído por Rüther e Müller-Hill (Rüther ; Müller-Hill, 1983) e contém como gene alvo de mutações o gene *LacZ* de *Escherichia coli* codificante da enzima β -galactosidase. Possui locais de restrição únicos para o enzima *HindIII*. O gene de resistência à ampicilina (*amp^R*) permite o crescimento selectivo de bactérias contendo o plasmídeo em meio de cultura a que foi adicionado esse antibiótico. Contém a sequência operadora lac, situada a montante do *LacZ*, à qual se liga a proteína repressora lacI. Possui uma origem de replicação (*ori*) ColE1 de *E. coli*. Finalmente, este plasmídeo contém o local de ligação da proteína activadora de catabolito (CAP), responsável pelo fenómeno de repressão por catabolito.

O transgene *LacZ* funciona como gene alvo e repórter de mutações, permitindo a sua deteção após exposição dos animais aos potenciais agentes genotóxicos. As mutações que ocorrem nos vários órgãos dos ratinhos podem ser detetadas depois da recuperação do transgene numa estirpe bacteriana deficiente no gene *LacZ* (Δ *LacZ*).

Utilizando este modelo, as mutações podem ser detetadas em vários órgãos do mesmo animal, incluindo nas gónadas, sem a existência de pressão seletiva sobre as células contendo mutações. Os dados existentes sugerem que os transgenes

respondem aos mutagêneos do mesmo modo que os genes endógenos, sendo por isso representativos do que sucede nestes (OECD, 2011). Também a caracterização molecular do tipo de mutações induzidas pode fornecer informação importante para a compreensão dos mecanismos de genotoxicidade dos agentes em estudo (Louro *et al.*, 2010; Louro; Silva, 2011).

Para além dos testes de genotoxicidade preconizados na Tabela 7, o ensaio do cometa é frequentemente utilizado *in vitro* ou *in vivo*, sendo considerado um indicador de lesões pré-mutagénicas ou primárias no DNA (EFSA, 2012). Baseia-se num método de visualização do DNA danificado em microgel de agarose, desenvolvido inicialmente por Singh *et al.*, que envolve a electroforese sob condições alcalinas ($\text{pH} \geq 13$) para a deteção de quebras de DNA em células isoladas (Tice *et al.*, 2000). Nestas condições de pH, um aumento na migração do DNA está associado com níveis elevados de quebras de cadeia simples e quebras de cadeia dupla no DNA, de locais da cadeia onde existe uma lesão que é convertida em quebra (locais lábeis às bases, AP sites) e ainda quebras de cadeia simples associadas a locais de reparação com excisão incompleta (Tice *et al.*, 2000). Deste modo, após a lise celular e migração electroforética, o DNA forma estruturas que, observadas ao microscópio após coloração, se assemelham a cometas em que o DNA danificado se separa do DNA intacto (ou “cabeça”) e forma uma “cauda” (Figura 22).



Figura 22. Microfotografias de alguns cometas, apresentando diferentes níveis de lesões no DNA.

Após coloração, a quantificação da intensidade da fluorescência na cabeça e na cauda do cometa, bem como o comprimento desta, permitem aferir a quantidade de quebras no DNA após exposição a um agente genotóxico, que é comparada com a mesma quantidade medida em células não expostas ao agente em estudo.

O ensaio do cometa pode ainda ser modificado para permitir a deteção específica de bases oxidadas (pirimidinas/purinas), através da utilização de endonucleases de reparação (Formamido-aminopirimidina glicosilase, FPG, ou

Endonuclease III; Tabelas 8). Com esta alteração, pode ser inferidos os danos oxidativos, contribuindo para o conhecimento dos mecanismos de acção.

Tabela 9. Exemplo de enzimas específicas para determinadas lesões no DNA (com base em Collins *et al.*, 2008).

Endonucleases de reparação	Seus substratos
Endonuclease III (Endo III)	Pirimidinas oxidadas
Formamidopirimidina glicosilase (FPG)	Purinas de anel aberto, 8-oxoguanina, formamidopirimidinas
8-Oxoguanina glicosilase humana (hOGG1)	Análogo humano da FPG
3-Metiladenina DNA glicosilase	3-Metiladenina
Endonuclease V (UV endonuclease)	Ciclobutano pirimidina
Uracilo DNA glicosilase	Uracilo no DNA

Uma modificação comum do ensaio do cometa é a detecção de 8-oxoguanina, bem como de outras purinas oxidadas, pela incorporação de uma digestão com a enzima bacteriana formamidopirimidina glicosilase (FPG; Collins *et al.*, 2008). Os microgeis tratados com FPG revelam as quebras no DNA e também as lesões reconhecidas pelo tratamento enzimático. A comparação com os microgeis não tratados enzimaticamente fornece uma medida das pirimidinas oxidadas/ purinas alteradas (“net FGP-sensitive sites”).

Embora o conjunto de testes de genotoxicidade existente atualmente permita identificar o potencial carcinogénico da maioria dos agentes físicos, químicos ou biológicos, as considerações expostas sobre as propriedades específicas dos NMs, conduzem a uma questão que tem sido amplamente discutida no meio científico (Maynard *et al.*, 2006; Oberdorster, 2010; Oberdörster; Oberdörster; Oberdörster, 2007): será a metodologia atual de avaliação de risco utilizada na UE para os compostos químicos, diretamente aplicável aos NMs, ou deverá ser modificada para se adequar às características específicas dos NMs?

A resposta a esta questão depende, por um lado, da existência de conhecimento científico detalhado sobre o comportamento dos NMs nos sistemas biológicos similares aos humanos, ou que sejam extrapoláveis para a espécie humana. Por outro lado, implica a validação das metodologias de avaliação de toxicidade, em especial de genotoxicidade, já existentes, bem como da sua

capacidade para detetarem os efeitos dos NMs nesses sistemas biológicos. Surgiu assim a Nanogenotoxicologia, que tem o objetivo de avaliar o potencial genotóxico dos NMs tentando, em paralelo, esclarecer as propriedades físico-químicas mais relevantes para esse tipo de efeitos (Singh *et al.*, 2009).

As secções seguintes resumem o conhecimento existente relativamente à avaliação da segurança dos NMs em estudo, amplamente utilizados em produtos de consumo, com especial enfoque no seu potencial genotóxico.

6.4. Nanomateriais de dióxido de titânio

Existem vários tipos de pigmento branco de dióxido de titânio, utilizados na produção de tintas e revestimentos. O dióxido de titânio é usado também em papel, plástico, cerâmica, borracha, tinta de impressoras, revestimentos do chão, catalisadores, tecidos e têxteis, cosméticos (e.g. em protetores solares), corantes alimentares, medicamentos e componentes electrónicos (NIOSH, 2011). A Tabela 10 resume alguns dados sobre o volume de produção e consumo de TiO_2 a nível mundial, em 2004.

Tabela 10. Produção mundial e consumo de dióxido de titânio (em milhares de toneladas) em 2004 (adaptado de IARC, 2010).

Região	Produção	Consumo
América do Norte		
• Canadá	76	104
• México	124	64
• USA	1511	1162
América Central e do Sul		
• Brasil	80	124
• Outros	0	85
Europa ocidental	1254	1183
Europa central e oriental	155	155
África e Médio Oriente		
• Arábia Saudita	90	30
• Outros, médio oriente	0	120
• África do Sul	20	28
• Outros de África	0	45
Japão	253	238
Oceania e Ásia		
• Australia	200	40
• China	350	540
• Índia e Paquistão	52	82
• Indonésia	0	49
• Malásia	50	15
• Filipinas	0	33
• República da Coreia	40	120
• Singapura	45	30
• Ásia sudoeste	—	—
• Taiwan (China)	120	66
• Tailândia	0	71
• Outros	0	29
<i>Total</i>	<i>4420</i>	<i>4423</i>

Os dados mais recentes, de acordo com os consultores SRI (<http://www.sriconsulting.com>), indicam que o mercado global para o TiO_2 é estimado em 10.000 toneladas por ano. A Comissão Europeia também tem estimativas ainda

superiores a este número (Comissão Europeia, 2012a). Cerca de 5.000 toneladas correspondem a produtos de cuidado pessoal, entre os quais 430 toneladas nos protetores solares.

Os diferentes nanomateriais de dióxido de titânio, embora com a mesma composição química, podem apresentar-se com quatro estruturas cristalinas diferentes: rutilo, anatase, broquite ou dióxido de titânio (B) (revisto por Buzea; Pacheco; Robbie, 2007), sendo as formas rutilo e anatase as mais frequentemente usadas em produtos de consumo.

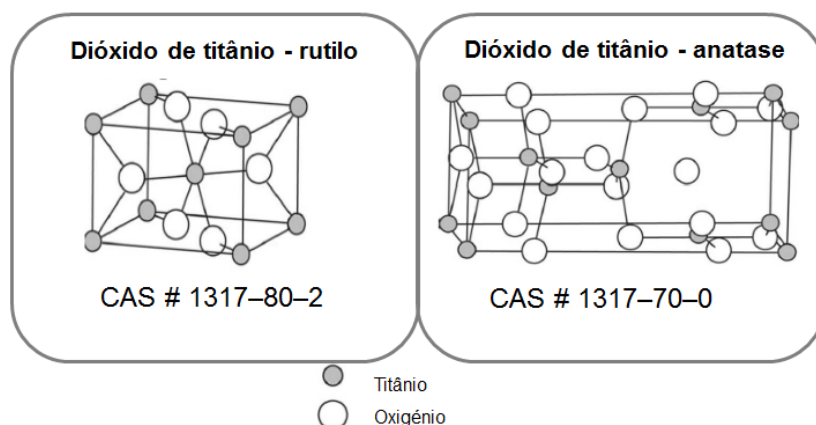


Figura 23. Formas cristalinas do dióxido de titânio (Buzea; Pacheco; Robbie, 2007; NIOSH, 2011).

Enquanto ambas as formas anatase e rutilo têm sistema cristalino tetragonal, a forma rutilo apresenta um arranjo mais denso dos átomos. Os NMs de dióxido de titânio medem entre 1 e 150 nm, tendo as partículas primárias dimensões entre 10–50 nm (IARC, 2010).

O dióxido de titânio foi registado no âmbito do REACH e, de acordo com a indústria, o registro abrange todas as formas de dióxido de titânio, nano ou não, sem diferenciação específica, tendo sido classificado como não perigoso (Comissão Europeia, 2012a).

Recentemente, a NIOSH recomendou limites de exposição de 0.3 mg/m^3 de ar para o dióxido de titânio nas formas nano, enquanto a forma normal ($>100\text{nm}$) tem por limite 2.4 mg/m^3 (NIOSH, 2011). O limite de exposição em Portugal para esta substância é de 10 mg/m^3 de ar, considerando o TWA (8-h tempo médio ponderado) (IARC, 2010). A recomendação da NIOSH representa níveis que, ao longo de uma vida de trabalho, se espera que reduzam o risco de cancro do pulmão para menos de 1 em 1000, com base nas experiências realizadas em ratos expostos por inalação

crónica (NIOSH, 2011). Por sua vez, os principais limites de exposição definidos em vários países variam entre 3-15 mg/m³ (IARC, 2010).

Como referimos anteriormente, embora não existam dados atuais sobre a exposição de trabalhadores aos NM de dióxido de titânio, os dados de 1981-83 indicam que 2.7 milhões de trabalhadores estavam potencialmente expostos a estes NMs, especialmente por via inalatória (US National Occupational Exposure Survey, 1981–83, Cincinnati, OH, EUA. Department of Health and Human Services, National Institute for Occupational Safety and Health cit. in IARC, 2010).

No entanto, de acordo com a revisão recente da NIOSH, os cinco estudos epidemiológicos já realizados sobre a exposição dos trabalhadores e da população ao dióxido de titânio (em pó, englobando sobretudo a exposição à forma não nanométrica de dióxido de titânio) não evidenciaram um risco acrescido de mortalidade ou morbilidade por cancro do pulmão (NIOSH, 2011). Estes estudos resumem-se na Tabela 11.

Tabela 11. Resumo de estudos epidemiológicos na literatura sobre a exposição a TiO₂.

Referência	Título do estudo	Estudo e principais conclusões
Chen and Fayerweather 1988, <i>cit. in</i> NIOSH, 2011	Epidemiologic study of workers exposed to titanium dioxide	-Avaliação da mortalidade e morbidade entre 2477 trabalhadores (homens) a trabalhar há mais de 1 ano em duas fábricas de TiO ₂ nos EUA. -O risco de desenvolvimento de cancro de pulmão ou outras doenças respiratórias fatais não é superior nos trabalhadores expostos. - Não se detetaram associações estatisticamente significativas entre a exposição a TiO ₂ e o risco de cancro de pulmão ou outras doenças respiratórias fatais. - Não se observaram casos de fibrose pulmonar entre os trabalhadores expostos a TiO ₂ .
Boffeta <i>et al.</i> , 2004, <i>cit. in</i> NIOSH, 2011	Mortality among workers employed in the titanium dioxide production industry in Europe.	-Estudo de <i>follow-up</i> em 15017 trabalhadores (14331 homens) de 11 fábricas de TiO ₂ na Europa. -A exposição foi estimada de acordo com a sua história ocupacional e a mortalidade foi comparada com as taxas nacionais. - O estudo não sugere um efeito carcinogénico do pó de TiO ₂ no pulmão humano.
Fryzek <i>et al.</i> , 2003, <i>cit. in</i> NIOSH, 2011	A cohort mortality study among titanium dioxide manufacturing workers in the United States	-Estudo da mortalidade entre 4241 trabalhadores de quatro fábricas de TiO ₂ nos EUA. - Não se observou associação com o risco de morte por cancro ou outras doenças, nem nenhum aumento na mortalidade associado ao nível de exposição ao TiO ₂ .
Boffetta <i>et al.</i> , 2001	Exposure to titanium dioxide and risk of lung cancer in a population-based study from Montreal	- Análise do risco de cancro do pulmão em residentes de Montreal, Canada, incluindo 857 casos de cancro do pulmão confirmados histologicamente e 533 em residentes saudáveis. - O estudo não sugere associação de cancro com a exposição a TiO ₂ .
Ramanakumar <i>et al.</i> , 2008	Risk of lung cancer following exposure to carbon black, titanium dioxide and talc: results from two case-control studies in Montreal.	-Análise da associação entre o risco de cancro do pulmão e a exposição a TiO ₂ . -Os resultados não mostram risco acrescido de cancro.

A NIOSH classificou os NMs de dióxido de titânio como potenciais agentes carcinogénicos em contexto ocupacional, embora considere não existir evidência suficiente para classificar do mesmo modo o dióxido de titânio fino (NIOSH, 2011). Na classificação da Agência Internacional para a Investigação em Cancro (*International Agency for Research on Cancer*, IARC), o dióxido de titânio é considerado como “possivelmente carcinogénico para humanos” (Grupo 2B) pois, muito embora não exista evidência adequada para a sua carcinogenicidade em humanos, há evidência suficiente de efeitos carcinogénicos em animais (IARC, 2010). Esta conclusão da IARC baseia-se na observação de desenvolvimento de cancro do trato respiratório em ratos expostos a pó de TiO_2 (IARC, 2010).

No que se refere ao seu potencial genotóxico, a investigação até ao momento não foi conclusiva: enquanto vários estudos realizados em bactérias revelaram não existir genotoxicidade induzida pelo dióxido de titânio (revistos por Sycheva *et al.*, 2011; IARC, 2010), foram já reportados efeitos positivos em células eucariotas e em animais (revistos em SCCS, 2013). Numa extensiva pesquisa na literatura, foram identificados 37 artigos científicos que descrevem 82 ensaios de genotoxicidade realizados *in vitro* (bactérias ou em células de mamífero em cultura). Estes artigos resumem-se nas Tabelas 12 e 13.

Tabela 12. Resumo dos principais resultados na literatura sobre a genotoxicidade do TiO₂ *in vitro*, onde não houve efeitos genotóxicos (negativos).

Referência	Nanomaterial de TiO ₂	Sistema experimental
Bhattacharya <i>et al.</i> , 2009	Anatase, Degussa GmbH	Ensaio do cometa em células do epitélio pulmonar (BEAS-2B) e fibroblastos pulmonares humanos (IMR-90).
Endo-Capron <i>et al.</i> , 1993, <i>cit in</i> IARC 2010	Anatase 50 µg/ml	Ensaio de síntese de DNA <i>unscheduled</i> em células pleurais mesoteliais de rato.
Guichard <i>et al.</i> , 2012	Anatase	Ensaio do micronúcleo em células de embrião de hamster sírio (SHE).
Gurr <i>et al.</i> , 2005	Anatase (≥200 nm)	Ensaio do micronúcleo em células do epitélio brônquico (BEAS-2B).
Hackenberg <i>et al.</i> , 2010	Anatase, Sigma–Aldrich (<25 nm) 10–100 µg/ml	Ensaio do cometa em células da mucosa nasal humana.
Hackenberg <i>et al.</i> , 2011a	Anatase, Sigma–Aldrich (<25 nm) 20–200 µg/ml por 24 h	Ensaio do cometa em culturas de linfócitos humanos; Localização dos NMs no citoplasma e alguns núcleos.
Ivett <i>et al.</i> , 1989, <i>cit in</i> IARC 2010	25 µg/mL	Ensaio de trocas de cromátídeos irmãos em células de ovário de hamster chinês (CHO).
Falck <i>et al.</i> , 2009	Rutilo (Sigma-Aldrich), 1–100 µg/cm ² , 24, 48 or 72h exposição	Ensaio do micronúcleo em células do epitélio brônquico BEAS-2B.
Kamp <i>et al.</i> , 1995, <i>cit in</i> IARC 2010	500 µg/mL	Ensaio do cometa em células pulmonares embrionárias humanas (WI-26).
Landsiedel <i>et al.</i> , 2010	Rutilo (10 - 50 nm) com e sem modificações de superfície, 75 - 300 µg/ml, 4 ou 24h exposição	Ensaio do micronúcleo em células de hamster chinês (V79).
Linnainmaa <i>et al.</i> , 1997	Anatase de 20nm e rutilo de 170 nm, 20 µg/cm ²	Ensaio do micronúcleo em células epiteliais de fígado de rato.
Miller <i>et al.</i> , 1995, <i>cit in</i>	10 µg/mL	Ensaio do micronúcleo em células de ovário de hamster chinês (CHO).

Nakagawa <i>et al.</i> , 1997	Anatase, Nippon-Aerosil (P25, 21 nm), Anatase, Wako (255nm), Rutilo, Wako (255 nm) e Rutilo TP-3, Fuji titan (420 nm)	<p>Ensaio de mutação em <i>Salmonella typhimurium</i> com fotoativação UV/VIS.</p> <p>Ensaio de mutação em <i>Salmonella typhimurium</i> sem fotoativação UV/VIS.</p> <p>Ensaio de cometa em células de linfoma de ratinho sem fotoativação UV/VIS (L5178Y).</p> <p>Ensaio de aberrações cromossômicas em células de hamster chinês (CHL/IU) sem fotoativação UV/VIS.</p>
Nam <i>et al.</i> , 2012	Anatase, Degussa GmbH (21 nm) 0–100 µg/ml	Cromoteste SOS em <i>Escherichia coli</i> E.
Wamer <i>et al.</i> , 1997	71.4 µg/mL (10 µg/cm ²)	Lesões oxidativas no DNA, em fibroblastos de pele humana (CRL1634).
Wang <i>et al.</i> , 2011	Anatase, exposição continua por 1,2 ou 60 dias, 10, 20, ou 40 µg/ml	Ensaio do cometa e ensaio de mutações em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1).
Woodruff <i>et al.</i> , 2012	Anatase, 10nm	Teste de Ames em <i>Salmonella typhimurium</i> ; Ensaio do cometa em células linfoblastoides humanas (TK6).
Hamzeh; Sunahara, 2013	Vive Nano Titania (Rutilo; Vive Nano Inc.)	Ensaio do cometa em fibroblastos de pulmão de hamster (V79).

Tabela 13. Resumo dos principais resultados na literatura sobre a genotoxicidade do TiO₂ *in vitro*, onde se observaram efeitos genotóxicos (positivos).

Referência	Nanomaterial de TiO ₂	Sistema experimental
Bhattacharya <i>et al.</i> , 2009	Anatase, Degussa GmbH	Determinação de adutos de DNA em células do epitélio brônquico (BEAS-2B) e fibroblastos pulmonares humanos (IMR-90).
Catálan <i>et al.</i> , 2012	Anatase, Sigma-Aldrich (<25 nm) 6,25–300 µg/ml	Ensaio de aberrações cromossômicas em culturas de linfócitos humanos isolados.
Dunford <i>et al.</i> , 1997	Amostras de TiO ₂ extraídas de protetores solares	Ensaio do cometa em fibroblastos humanos (MRC-5) com iluminação solar.
Ghosh <i>et al.</i> , 2010	Anatase, Sigma-Aldrich (90-110 nm) 0.25 mM	Ensaio do cometa em culturas de linfócitos humanos (negativo em doses mais altas).
Gurr <i>et al.</i> , 2005	Anatase (10 - 20 nm)	Ensaio do micronúcleo em células do epitélio brônquico (BEAS-2B).
Jaeger <i>et al.</i> , 2012	Anatase, Sigma-Aldrich (200 nm) 0.5-50 µg/ml e Anatase-rutilo, Degussa (P-25, 70% anatase/30% rutilo)	Ensaio do micronúcleo em queratinócitos humanos (HaCaT).
Jugan <i>et al.</i> , 2012	Anatase (3 NMs) e rutilo (2 NMs), 100 µg/ml, 4 e 24h exposição	Ensaio do cometa em células de adenocarcinoma pulmonar (A549).
Kang <i>et al.</i> , 2008	Anatase –rutilo (P-25, 70% anatase/30% rutilo; Degussa), 20-100 µg/ml	Ensaio do cometa e do micronúcleo em culturas de linfócitos humanos isolados
Kermanizadeh <i>et al.</i> , 2012	Anatase (NM-101, JRC) e rutilo (NRCWE-001, NRCWE-002, NRCWE-003, NRCWE-004)	Ensaio do cometa modificado com enzima FPG em células de hepatoblastoma (C3A).
Lu <i>et al.</i> , 1998	TiO ₂ , 0-5 µM	Ensaio de troca de cromátídeos irmãos em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1)
Magdolenova <i>et al.</i> , 2012a	Anatase-rutilo (NM-105 JRC, 21 nm) ou Aeroxide P25.), 0-75	Ensaio do cometa e ensaio do cometa modificado com FPG em células linfoblastoides humanas (TK6), em fibroblastos de rim de macaco (Cos-1) e

	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	em células epiteliais embrionárias humanas (EUE).
Nakagawa <i>et al.</i> , 1997	Anatase, Nippon-Aerosil (P25, 21 nm), Anatase, Wako (255nm), Rutilo, Wako (255 nm) e Rutilo TP-3, Fuji titan (420 nm) com fotoativação UV/VIS	Ensaio de cometa em células de linfoma de ratinho (L5178Y). Ensaio de aberrações cromossômicas em células de hamster chinês (CHL/IU).
Osman <i>et al.</i> , 2010 (resumo)	Não definido	Ensaio do micronúcleo e do cometa em células de carcinoma da laringe humano (HEp-2).
Rahman <i>et al.</i> , 2002	TiO ₂ ultrafino ≤ 20 nm, 0.5-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Ensaio do micronúcleo em fibroblastos embrionários de hamster sírio (SHE).
Roszak <i>et al.</i> , 2013	Anatase- rutilo, Nanometer Titanium Dioxide (TJ Technologies & Materials Inc.)	Ensaio do cometa em fibroblastos murinos (Balb/3T3). Ensaio do micronúcleo em fibroblastos de pulmão de hamster (V79).
Saquib <i>et al.</i> , 2012	Rutilo TiO ₂ , 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Ensaio do cometa (neutro) em células amnióticas epiteliais humanas (WISH).
Setyawati <i>et al.</i> , 2013	Anatase-rutilo-amorfa (73–85%; 14–17%; 2–13% (AEROXIDEVR P25; Degussa), 10 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Quantificação de γ -H2AX (indicador de quebras de cadeia dupla no DNA).
Shukla <i>et al.</i> , 2011	Anatase (Sigma-Aldrich)	Ensaio do micronúcleo e do cometa modificado com FPG em células da epiderme humana (A431).
Srivastava <i>et al.</i> , 2013	Anatase (< 25 nm, Sigma Aldrich), 1-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 24h	Ensaio do micronucleo em células de adenocarcinoma pulmonar (A549).
Toyooka <i>et al.</i> , 2012	Anatase (5 nm e <5000 nm, Sigma)	Quantificação de γ -H2AX e de quebras de cadeia dupla no DNA por eletroforese em células de adenocarcinoma pulmonar (A549).
Türkez; Geyikoglu, 2007	Anatase (Sigma) 1- 10 microM	Ensaio de troca de cromatídeos irmãos e do micronucleo em culturas de sangue total humano.
Wang <i>et al.</i> , 2007a	Anatase , Sigma–Aldrich) 26, 65 and 130 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Ensaio do cometa e ensaio de mutações em células- B linfoblastoides (WIL2-NS).

Xu <i>et al.</i> , 2009	Anatase, Sigma-Aldrich, (5 nm) ou 40 nm (Inframat Advanced Materials LLC), 0.1-30 µg/ml	Ensaio de mutações em fibroblastos embrionários primários de ratinhos transgênicos <i>gpt</i> delta (MEF).
Yegles <i>et al.</i> , 1993, cit in IARC 2010	Anatase, 10 µg/cm ²	Ensaio de aberrações cromossômicas em células pleurais mesoteliais de rato.
Falck <i>et al.</i> , 2009	Anatase (Sigma-Aldrich), 1–100 µg/cm ² , 24, 48 or 72h exposição	Ensaio do Cometa em células do epitélio brônquico (BEAS-2B). Ensaio do micronúcleo em células BEAS-2B.
Hamzeh; Sunahara, 2013	Nano-TiO ₂ MT15 (anatase; MTI Corporation; P25 (anatase/rutilo; Evonik Industries); Nanofilament rutile (Sigma–Aldrich); Hombitan LW-S (anatase; Sachtleben Chemie)	Ensaio do cometa em fibroblastos de pulmão de hamster (V79).

Entre estes 82 ensaios de genotoxicidade, 43 ensaios descreveram resultados positivos e 39 negativos.

De modo análogo, a pesquisa bibliográfica, permitiu identificar 12 artigos que descrevem 20 ensaios de genotoxicidade realizados *in vivo*, i.e., em organismos complexos, ratos ou ratinhos, que se resumem nas Tabelas 14 e 15.

Tabela 14. Resumo dos principais resultados sobre a genotoxicidade do TiO₂ *in vivo*, onde não houve efeitos genotóxicos (negativos).

Referência	Nanomaterial de TiO ₂	Sistema experimental
Boisen <i>et al.</i> , 2012	Rutilo com modificação de superfície (UV-Titan L181, Kemira), ~42.4 mg/m ³	Ensaio de mutações em ESTR em fêmeas de ratinhos expostas in útero por inalação.
Landsiedel <i>et al.</i> , 2010	Rutilo (10 - 50 nm) T-LiteTM SF, 10 mg/m ³ /tratamento/dia, 5 dias	Ensaio do Cometa no fluido bronco-alveolar de ratos Wistar expostos por inalação.
Lindberg <i>et al.</i> , 2012	Anatase–broquite, aerossóis, 5 dias	Ensaio do Cometa em células alveolares tipo II e células Clara; Ensaio do micronúcleo em sangue periférico de ratinhos C57Bl6.
Jugan <i>et al.</i> , 2012	Anatase (2 NMs) 50, 100 e 200 µg/ml, 4 e 24h exposição	Ensaio do micronúcleo em células de adenocarcinoma pulmonar (A549).
Naya <i>et al.</i> , 2012	Anatase ST-01, Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd (5 nm, área superficial 316 m ² /g) 1.0 ou 5.0 mg/kg	Ensaio do cometa em ratos Crl: CD (SD) expostos por instilação intratraqueal.
Rehn <i>et al.</i> , 2003	Anatase-Rutilo modificado com trimetoxioctilsilano, Degussa (20 nm,)	Ensaio de adutos 8-oxoguanina em células do fluido bronco-alveolar de ratos expostos por instilação.
Saber <i>et al.</i> , 2011 cit. in Klien; Godnić-Cvar, 2012	Rutilo modificado (NANOTiO ₂) 18 µg, 54 µg, 162 µg	Ensaio do cometa em células bronco-alveolares de ratinhos expostos por instilação intratraqueal.
Sadiq <i>et al.</i> , 2012	Anatase, 10 nm , doses de 0.5, 5 e 50 mg/kg/dia, por 3 dias	Ensaio de mutações no gene Pig-a e ensaio do micronúcleo em ratinhos expostos i.v.
Sycheva <i>et al.</i> , 2011	Anatase (Sensient Cosmetic Technologies), 40, 200 e 1000 mg/kg, 7 dias	Ensaio do micronúcleo em eritrócitos e cólon de ratinhos CBAB6F1 expostos por via oral.

Tabela 15. Resumo dos principais resultados sobre a genotoxicidade do TiO₂ *in vivo*, onde se observaram efeitos genotóxicos (positivos).

Referência	Nanomaterial de TiO ₂	Sistema experimental
Driscoll et al, 1997	Anatase, Fisher Scientific (180 nm, 8,8 m ² /g), 2x 5 e 50 mg/Kg	Ensaio de mutações em hprt em células pulmonares de ratos Fischer F344 expostos por instilação intratraqueal, 15 meses após exposição.
Hwang et al., 2010	TiO ₂ (forma não especificada) Sigma-Aldrich (≤100 nm) 20 mg/kg TiO ₂ , 2x por semana, 12 semanas	Ensaio do cometa e determinação de 8-oxoguanina em células mononucleares de sangue periférico de ratinhos C57BL/6 expostos por instilação intratraqueal.
Saber et al., 2011 cit. in (Klien; Godnić-Cvar, 2012)	Anatase- Rutilo, 54 µg	Ensaio do cometa em pulmão de ratinhos expostos por instilação intratraqueal.
Shelby et al., 1993 cit in Sycheva et al., 2011	(forma não especificada) 1000 mg/kg bw	Ensaio do micronúcleo em medula óssea e sangue periférico de ratinhos expostos i.p..
Sycheva et al., 2011	Anatase modificada com semitecone, Sensient Cosmetic Technologies (33,2 nm) 40, 200 e 1000 mg/kg, 7 dias	Ensaio do cometa em fígado e medula óssea de ratinhos CBAB6F1 expostos por via oral.
Trouiller et al., 2009	Anatase- rutilo (75% - 25%), 500 mg/kg na água, 5 dias	Ensaio do cometa e do micronúcleo em sangue de ratinhos expostos através da água.
	Anatase- rutilo (75% - 25%), 500 mg/kg na água, 5 dias	Ensaio de mutações em ratinhos expostos <i>in utero</i> através da água

Assim, dos 20 estudos *in vivo* descritos na literatura, 9 apresentam resultados positivos e os restantes 11 são negativos relativamente à genotoxicidade do TiO₂.

Considerando o panorama descrito nas Tabelas anteriores, verifica-se que 50% dos 102 testes de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* descritos na literatura sugerem o efeito genotóxico do TiO₂. Na opinião emitida pelo SCCS, à luz da bibliografia atual, o potencial para o TiO₂ causar lesões no DNA foi claramente demonstrado para alguns NMs (SCCS, 2013).

No entanto, é evidente nestas tabelas que os diferentes resultados refletem, diferentes características dos NMs investigados, como a forma cristalina ou a pureza, diferentes procedimentos usados para a sua dispersão em meio aquoso (p.ex. meio

para cultura celular ou veículo para administração em animais), diferentes vias de exposição, ou ainda diferenças entre os modelos experimentais utilizados. Globalmente, o “corpo de evidência” relativamente à existência ou não de genotoxicidade associada aos NM de dióxido de titânio, bem como o modo como essa genotoxicidade surge, necessita ainda ser esclarecido.

Outro tipo de efeitos adversos a considerar, em termos de impacto a longo-termo para o ambiente e para a saúde humana, é a desregulação endócrina. Num estudo recente, Wang *et al.* (2011) observaram que uma exposição prolongada a NM de dióxido de titânio afetou negativamente a reprodução de peixes-zebra e a sobrevivência dos embriões, independentemente da concentração (Wang *et al.*, 2011). Os resultados da análise histológica e do estudo de expressão génica permitiram, respetivamente, caracterizar um atraso na foliculogénese bem como um perfil de expressão génica compatível com alterações da maturação e da função dos ovários dos peixes expostos a dióxido de titânio, confirmando que este NM pode ser tóxico ao nível do sistema reprodutor dessa espécie. Assim, sugere-se que a contaminação de ambientes aquáticos com NM de dióxido de titânio, mesmo em baixas doses, pode ter impacto na reprodução das espécies, efeito que, até ao momento, não tinha sido descrito, constituindo mais um motivo para a investigação do potencial impacto dos NM no ambiente e na saúde humana. Outros estudos, revistos por Lu *et al.*, sugerem a possibilidade da interferência dos NMs com o sistema endócrino, aspeto que deverá ser mais investigado no futuro (Lu *et al.*, 2013).

6.5. Nanotubos de carbono

Os nanotubos de carbono (NTCs) são um tipo de nanomateriais manufacturados cujas aplicações têm vindo a aumentar muito significativamente. Consistem em cilindros de carbono à escala nano, constituídos por folhas de grafeno (átomos de carbono ligados num padrão hexagonal), podendo variar na sua forma, dimensão, características físicas, revestimentos, composição química ou funcionalização (NIOSH, 2013).

Os nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT) têm um diâmetro de cerca de 1 nm, sendo formados por 1 só cilindro, enquanto os nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT) são constituídos por numerosos SWCNT concêntricos, possuindo diâmetros de cerca de 2-100 nm; existem ainda as nanofibras de carbono com diâmetros entre 40 e 200 nm (NIOSH, 2013).

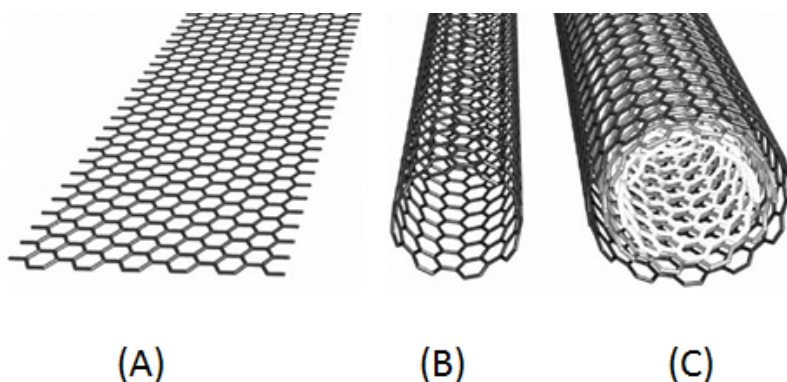


Figura 24. Representação esquemática de (A) folha de grafeno; (B) nanotubos de carbono de parede simples; (C) nanotubos de carbono de parede múltipla (Kreupl *et al.*, 2004).

Os MWCNTs foram registados no REACH como nanomateriais, não tendo sido classificados como perigosos (Comissão Europeia, 2012a). No entanto existe outro registo de MWCNTs como grafite, indicando que a substância é um NM perigoso (Comissão Europeia, 2012a). Este último foi classificado com os seguintes perigos: H319: Causa irritação dos olhos grave; e H335: Pode causar irritação respiratória. O limite ocupacional de exposição a NTCs foi estabelecido com $1\mu\text{g}/\text{m}^3$ considerando 8-h de tempo médio ponderado (NIOSH, 2013).

Os CNT são mecanicamente muito resistentes, flexíveis e bons condutores de eletricidade, o que permite a sua utilização em diversas aplicações, nomeadamente, em compósitos reforçados, sensores e electrónica (The Royal Society & The Royal Academy of Engineering, 2004). De acordo com o SRI, o mercado dos NTCs (mais finos que 20 nm) envolveu 200-250 toneladas (€30-40 milhões, sobretudo em MWCNTs) em 2009, sendo a sua principal utilização em produtos para conferirem condutividade elétrica a materiais de plástico, como e.g. discos rígidos (perigoso Comissão Europeia, 2012a).

Durante o seu ciclo de vida, os CNTs podem atingir o ambiente, não se sabendo, porém, como se comportam na cadeia alimentar. Não existem dados de estudos epidemiológicos ou de biomonitorização até à data que apontem para efeitos adversos no Homem (Becker *et al.*, 2011). Na ausência de dados epidemiológicos, a análise de risco baseia-se apenas em dados provenientes de ensaios em animais.

As semelhanças no tamanho e forma entre os CNTs e as fibras de asbestos têm gerado preocupações sobre a sua segurança. A principal questão deriva não só da sua dimensão nano, mas também da estrutura fibrosa que os torna semelhantes, neste aspeto, aos asbestos. Num estudo recente, após injeção intraperitoneal de MWCNTs em ratinhos, foi mesmo sugerido um mecanismo de patogenicidade semelhante ao dos asbestos (Poland *et al.*, 2008). Porém, em vez de se desenvolver cancro, verificou-se antes a encapsulação dos CNT pelas células multinucleadas do sistema imunitário, numa aparente “fagocitose frustrada”. Em contraste, Takagi *et al.* após exposição de ratinhos p53^{+/-}, que se sabe serem sensíveis aos asbestos, a uma dose elevada de MWCNTs, observou a indução de mesotelioma, uma neoplasia maligna associada à exposição a asbestos (Takagi *et al.*, 2008). Mais recentemente, os trabalhos de Muller *et al.* não revelaram indução de carcinogénese em ratos expostos a MWCNT (Muller *et al.*, 2009), ficando assim por esclarecer a questão da analogia com os asbestos.

A carcinogénese induzida por fibras é, provavelmente, um processo complexo envolvendo um stresse genotóxico de longo termo. Poder-se-á assumir que as fibras do NM são genotóxicas primariamente através da interação direta com o ADN, o aparelho mitótico ou via stresse oxidativo e, secundariamente, em consequência da resposta inflamatória. Considerando o paradigma das fibras, sustentado na inflamação crónica como precursora do processo carcinogénico, vários estudos têm investigado a ocorrência de respostas inflamatórias após exposição de animais a NTCs. Inicialmente, os estudos de Muller mostraram a indução de inflamação por instilação

intratraqueal de MWCNTs (Muller *et al.*, 2005). Ensaios em ratos expostos por inalação de MWCNTs demonstraram a ocorrência de lesões no pulmão (inflamação e formação de granulomas), embora não tenham revelado toxicidade sistêmica (Ma-Hock *et al.*, 2009). Porter *et al.* (2010) observaram também inflamação pulmonar e fibrose em ratinhos expostos a MWCNT. Por outro lado, em ratinhos C57BL/6, outros autores não verificaram inflamação dos pulmões nem lesões, mas sim alterações imunitárias sistêmicas após inalação de MWCNT (Mitchell *et al.*, 2007). Estudos de toxicogenômica identificaram a exposição a MWCNTs como causa de alterações da expressão gênica num conjunto de biomarcadores de cancro do pulmão em ratinhos (Pacurari *et al.*, 2011). Os estudos de Ryman-Rasmussen *et al.* (2009) sugeriram que uma inflamação alérgica pré-existente poderia aumentar a sensibilidade à inalação de MWCNT, efeito confirmado no estudo de Park *et al.* (2009).

Relativamente a genotoxicidade, existem muitas evidências de indução de lesões no DNA pelos MWCNTs mas ainda existem resultados contraditórios.

Numa extensiva pesquisa bibliográfica, foram identificados 22 artigos que descrevem 60 ensaios de genotoxicidade realizados em bactérias ou em células de mamífero em cultura, que se resumem nas Tabelas 16 e 17.

Tabela 16. Resumo dos principais resultados na literatura sobre a genotoxicidade do nanotubos de carbono *in vitro*, onde não se observaram efeitos genotóxicos (negativos).

Referência	Nanomaterial	Sistema experimental
Corradi et al, 2012	NM-402 (MWCNT, JRC) 50-250 µg/ml	Ensaio do micronúcleo em células de adenocarcinoma humano (A549). Resultado não determinado devido à aglomeração dos NMs.
Ema et al, 2012	MWCNTs: NMWCNT (Nikkiso Co., Ltd.) e MWNT-7 (Mitsui & Co., Ltd.), 6.25- 100 µg/mL	Ensaio de mutagenicidade em <i>Salmonella typhimurium</i> e em <i>Escherichia coli</i> . Ensaio de aberrações cromossômicas estruturais em fibroblastos de pulmão de hamster chinês (CHL/IU).
Szend; Varga, 2008	SWCNT e MWCNT (Shenzhen Nanotech. Port Co. Ltd), 1 mg/ml	Ensaio do micronúcleo e ensaio de trocas de cromátídeos irmãos em linfócitos humanos.
Kisin et al., 2007	SWCNT (CNI), 12-96 µg/cm ²	Ensaio de mutações em <i>Salmonella</i> (teste de Ames).
Jacobsen et al., 2008	EliCarb SWCNT , 0- 200 µg/ml	Ensaio de mutações em células epiteliais de pulmão de ratinhos Muta Mouse (FE1-MML).
Wirnitzer et al, 2009	Baytubes (Bayer MaterialScience), i.e. aglomerados de MWCNT	Ensaio de aberrações cromossômicas em fibroblastos de pulmão (V79). Ensaio de mutações em <i>Salmonella</i> .
Kim et al., 2011	MWCNT, CM-95, (Hanwha Nanotech)	Ensaio de mutagenese em <i>Salmonella</i> (teste de Ames). Ensaio do micronúcleo células de ovário de hamster chinês (CHO-K1).
Lindberg et al., 2013	SWCNTs (product no. 900-1351) e MWCNTs (product no. 900-1260; SES Research), 19–760 µg/ml	Ensaio do micronúcleo em células humanas do epitélio brônquico (BEAS-2B) e em células mesoteliais humanas (MeT-5A).
	MWCNTs (product no. 900-1260; SES Research), 19–760 µg/ml	Ensaio do cometa em células mesoteliais humanas (MeT-5A).

SWCNT = nanotubo de carbono de parede simples; MWCNT = nanotubo de carbono de parede múltipla.

Tabela 17. Resumo dos principais resultados na literatura sobre a genotoxicidade do nanotubos de carbono *in vitro*, onde se observaram efeitos genotóxicos (positivos).

Referência	Nanomaterial	Sistema experimental
Asakura <i>et al.</i> , 2010	MWCNT-7 (Mitsui&Co.)	Ensaio de aberrações cromossômicas, micronúcleo e mutações no gene hprt em células de pulmão de hamster chinês (CHL/IU).
Catalán <i>et al.</i> , 2011	SWCNT e MWCNTs (SES Research), 6.25–300 µg/ml, 48h exposição	Ensaio de aberrações cromossômicas em culturas de linfócitos humanos.
Cavallo <i>et al.</i> , 2012	MWCNT (HeJi Inc.) 5-100 µg/ml	Ensaio do cometa em células de adenocarcinoma humano (A549).
Cveticanin <i>et al.</i> , 2010	SWCNT e MWCNTs, 25-150 µl/ml	Ensaio do micronúcleo e de quantificação de γH2AX como indicador de quebras de cadeia dupla no DNA em linfócitos humanos.
Di Giorgio <i>et al.</i> , 2011	MWCNT e SWCNT (Sigma)	Ensaio do cometa e ensaio do micronúcleo em células de macrófagos de ratinho transformadas (RAW 264.7).
Ema <i>et al.</i> , 2012	Dois MWCNTs: NMWCNT (Nikkiso Co., Ltd.) e MWNT-7 (Mitsui & Co., Ltd.), 6.25- 100 µg/mL	Ensaio de aberrações cromossômicas numéricas em fibroblastos de pulmão de hamster chinês (CHL/IU).
Ghosh <i>et al.</i> , 2011	MWCNT (Sigma-Aldrich), 0-10 µg/ml	Ensaio do cometa em linfócitos humanos.
Guo <i>et al.</i> , 2011	MWCNTs	Ensaio de quantificação de γH2AX como indicador de quebras de cadeia dupla no DNA em células endoteliais humanas da veia umbilical (HUVECs).
Kato <i>et al.</i> , 2013	MWCNTs (MITSUI MWCNT-7)	Ensaio do micronúcleo em células de adenocarcinoma humano (A549) 20-200 µg/ml, exposição 6h. Ensaio de trocas de cromátídeos irmãos em células de ovário de hamster chinês (CHO) expostas 1h, 0.1-2 µg/ml.
Lindberg <i>et al.</i> , 2013	SWCNTs (product no. 900-1351) e MWCNTs (product no. 900-1260; SES Research), 19–760 µg/ml	Ensaio do cometa em células mesoteliais humanas (MeT-5A).
	SWCNTs (product no. 900-1260; SES	Ensaio do cometa em células humanas do epitélio brônquico (BEAS-2B)

	Research), 19–760 µg/ml	
Lindberg <i>et al.</i> , 2009	SWCNT (Sigma), 3.6-360 µg/ml	Ensaio do cometa e ensaio do micronúcleo em células humanas do epitélio brônquico (BEAS-2B).
Muller <i>et al.</i> , 2008	MWCNT (Faculte´s universitaires Notre-Dame de la Paix, Belgium)	Ensaio do micronúcleo em células imortalizadas RLE e em células de carcinoma da mama humano (MCF-7).
Ursini <i>et al.</i> , 2012	MWCNT e MWCNT-OH (HeJi), 1-40 µg/ml, 2, 4 and 24h	Ensaio cometa modificado com FPG em células de adenocarcinoma humano (A549).
Zhu <i>et al.</i> , 2007	MWCNT (5 µg/ml)	Ensaio de mutações em aprt em células estaminais embrionárias de ratinho (ES).
Migliore <i>et al.</i> , 2010	SWCNT e MWCNTs (Sigma-Aldrich), 0.208 to 20.83 µg/cm ²	Ensaio do cometa modificado com Endo III e FPG e ensaio do micronúcleo em células de macrófagos de ratinho transformadas (RAW 264.7).
Kisin <i>et al.</i> , 2007	SWCNT (CNI), 12-96 µg/cm ²	Ensaio de mutações em <i>Salmonella</i> (teste de Ames). Ensaio do cometa modificado com Endo III e FPG e ensaio do micronúcleo em fibroblastos de pulmão de hamster chinês (V79).
Kisin <i>et al.</i> , 2011	SWCNT (CNI), 3- 48 µg/cm ² , 24 h.	Ensaio do cometa e ensaio do micronúcleo em fibroblastos de pulmão (V79).
Jacobsen <i>et al.</i> 2008;	EliCarb SWCNT , 0- 200 µg/ml	Ensaio do cometa modificado com FPG em células epiteliais de pulmão do ratinho transgênico Muta Mouse (FE1-MML).
Pacurari <i>et al.</i> , 2008	SWCNTs	Ensaio de quantificação de γH2AX em células mesoteliais humanas normais ou malignas.
Patlolla <i>et al.</i> , 2010	MWCNT (NanoLab Inc.) 40, 200, 400 µg/ml	Ensaio do cometa em fibroblastos dérmicos humanos normais (NHDF).

SWCNT = nanotubo de carbono de parede simples; MWCNT = nanotubo de carbono de parede múltipla.

Os ensaios de mutações em bactérias e ensaios citogenéticos em linfócitos humanos (micronúcleo e SCEs após 1 mg/ml de MWCNT) revelaram-se negativos (Szendi & Varga, 2008). Também ensaios em células de pulmão de hamster chinês não revelaram indução de micronúcleos nem mutações no gene endógeno *hprt*, embora demonstrassem a ocorrência de aberrações cromossômicas numéricas

(Asakura *et al.*, 2010). Neste último estudo, foi verificada a internalização dos MWCNT na célula, que se localizavam no citoplasma, sugerindo uma acção indirecta dos MWCNT sobre o DNA (Asakura *et al.*, 2010). Não se observou aumento de micronúcleos em eritrocitos de larvas do anfíbio *Xenopus laevis* expostas a MWCNT (Mouchet *et al.*, 2008). Em contraste, em linfócitos humanos a exposição a MWCNTs aumentou a incidência de micronúcleo de um modo dependente da dose, com concomitante declínio da proliferação celular e um aumento de γ -H2AX foci (Cveticanin *et al.*, 2010). Os MWNTs aumentaram a frequência de mutação no gene *Aprt* de células embrionárias de ratinho (Zhu *et al.*, 2007) e revelaram ser genotóxicos em células epiteliais brônquicas humanas, BEAS 2B, por aumentarem as lesões no DNA (ensaio do cometa) e a frequência de micronúcleo (Lindberg *et al.*, 2009). Em pneumócitos de ratos expostos intratraquealmente a MWCNT e em células epiteliais de rato tratadas com MWCNTs, também houve um aumento de micronucleos (Muller *et al.*, 2008). Em células endoteliais humanas da veia umbilical, os MWCNT também causaram citotoxicidade, lesões no DNA, stress oxidativo e inibição do crescimento celular através de apoptose (Guo *et al.*, 2011). Na linha celular RAW, de macrófagos de ratinho, os MWCNT induziram libertação de ROS, necrose e aberrações cromossómicas mas não causaram resposta inflamatória (Di Giorgio *et al.*, 2011). Entre estes 60 ensaios de genotoxicidade *in vitro*, 40 ensaios tiveram resultados positivos e 19 negativos. Entre estes 60 estudos, 36 reportavam ensaios com MWCNTs, sendo 15 positivos para este tipo de nanotubos.

Relativamente a ensaios de genotoxicidade *in vivo*, a pesquisa bibliográfica, permitiu identificar 9 artigos que apresentam 15 ensaios de genotoxicidade realizados em organismos complexos, que se resumem nas Tabela 18 e 19.

Tabela 18. Resumo dos principais resultados na literatura sobre a genotoxicidade do nanotubos de carbono *in vivo*, onde não se observaram efeitos genotóxicos (negativos).

Referência	Nanomaterial	Sistema experimental
Ema <i>et al.</i> , 2012	Dois MWCNTs: NMWCNT (Nikkiso Co., Ltd.) e MWNT-7 (Mitsui & Co., Ltd.), 5-20 mg/kg, oral	Ensaio do micronúcleo em eritrócitos de ratinhos ICR.
Ema <i>et al.</i> , 2013	NMWCNT (Nikkiso Co., Ltd.), 0.2 or 1.0mg/kg ou a 2 doses de 0.04 or 0.2mg/kg, instilação intratraqueal	Ensaio do cometa em células do pulmão de ratos Crl/CD(SD).
Kim <i>et al.</i> , 2011	MWCNTs CM-95, (Hanwha Nanotech)	Ensaio do micronúcleo em eritrócitos de ratinhos ICR.
Mouchet <i>et al.</i> , 2008	DWCNTs (parede dupla), 10 a 500 mg/l	Ensaio do micronúcleo em eritrócitos de larva de anfíbio <i>Xenopus laevis</i> .
Muller <i>et al.</i> , 2009	MWCNT (20 mg/animal, i.p.)	Ensaio de carcinogenese de 2-anos em ratos Wistar para testar mesotelioma.
Szendj; Varga, 2008	SWCNT e MWCNT (Shenzhen Nanotech. Port Co. Ltd), 50 mg/kg, via oral	Ensaio de mutagenicidade (teste de Ames) na urina de ratos.

SWCNT = nanotubo de carbono de parede simples; MWCNT = nanotubo de carbono de parede múltipla.

Tabela 19. Resumo dos principais resultados na literatura sobre a genotoxicidade do nanotubos de carbono *in vivo*, onde se observaram efeitos genotóxico (positivos).

Referência	Nanomaterial	Sistema experimental
Gosh <i>et al.</i> , 2011	MWCNT (Sigma-Aldrich), 10, 20 e 50 µg/mL	Ensaio de aberrações cromossômicas, micronúcleo e ensaio do cometa em cebola (<i>Allium cepa</i>).
Kato <i>et al.</i> , 2013	MWCNTs (MITSUI MWCNT-7), 0.05 or 0.2 mg/animal, instilação intratraqueal	Ensaio do cometa em células do pulmão de ratinhos ICR.
Patlolla <i>et al.</i> , 2011	MWCNT funcionalizados e não funcionalizados (NanoLab Inc) 0.25, 0.5, 0.75, mg/kg, i.p., por 5 dias	Ensaio do micronúcleo, aberrações cromossômicas e cometa em medula óssea de ratinhos Swiss-Webster.

SWCNT = nanotubo de carbono de parede simples; MWCNT = nanotubo de carbono de parede múltipla.

Dos 15 ensaios *in vivo* descritos, 7 são positivos e os restantes 6 são negativos.

Considerando assim o cenário descrito nas Tabelas anteriores, verifica-se que 63% dos 74 testes de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* descritos na literatura sugerem o efeito genotóxico dos NTCs. Porém, esta análise é muito geral e não pondera os diferentes NMs de NTCs utilizados em cada ensaio.

Globalmente, também no caso dos nanotubos de carbono, os dados são inconsistentes e existe a necessidade de esclarecer as suas propriedades e mecanismos de genotoxicidade para garantir a segurança da sua utilização.

6.6. Nanomateriais de óxido de zinco

Os NMs de óxido de zinco (ZnO; CAS No. 1314-13-2) são semicondutores utilizados na produção de aparelhos electrónicos e também, graças às suas propriedades fotocatalíticas, em protetores solares e bioremediação (Yeber *et al.*, 2000, *cit. in* Hackenberg *et al.*, 2011a). De acordo com o SRI, o mercado global para a nanoforma de óxido de zinco é de vários milhares de toneladas por ano, sendo a sua maior parte utilizada com filtro UV em cosméticos perigoso perigoso (Comissão Europeia, 2012).

De fórmula molecular ZnO, o óxido de zinco é pouco solúvel em meio aquoso e apresenta a estrutura cristalina representada na Figura 25:

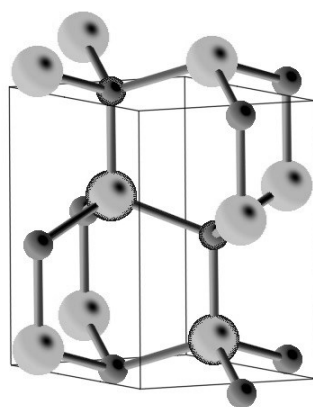


Figura 25. Estrutura cristalina do ZnO, hexagonal, em “wurtzite”. As esferas grandes representam o zinco e as esferas pequenas representam o oxigénio. (Fonte: <http://som.web.cmu.edu/structures/S014-ZnO.html>).

A substância óxido de zinco foi registada no REACH, sem no entanto ser especificada se se trata da forma nano. Foi classificada com o seguinte perigo (GHS): “Aquatic Chronic 1”- H410: Muito tóxico para a vida aquática com efeitos de longa duração perigoso (Comissão Europeia, 2012).

O óxido de zinco é muitas vezes utilizado na sua forma sem modificações de superfície (“coating”). No entanto pode ser também utilizado após a modificação da sua superfície pela adição de materiais orgânicos e inorgânicos tais como sílica, dimetilcone, silanos, etc. (SCCS, 2012).

Diversos estudos toxicológicos têm procurado analisar a segurança dos NMs de óxido de zinco (revistos em Schilling *et al.*, 2010) e, de uma forma geral, estes são

considerados seguros. Recentemente, o SCCS emitiu uma opinião onde refere que o ZnO pode ser utilizado com segurança em produtos cosméticos, de uso tópico ou oral, desde que abaixo da concentração de 25%, embora colocando em questão a sua utilização em produtos que possibilitem a sua inalação uma vez que reconhece a indução de inflamação dos pulmões pelo ZnO inalado (SCCS, 2013). No entanto, um estudo em voluntários permitiu concluir que a inalação de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ durante 2 horas se situa abaixo do limiar de efeitos sistémicos agudos de inflamação (Beckett *et al.*, 2005). Neste mesmo estudo verificou-se que a deposição do ZnO na forma nano no trato respiratório era muito superior à do óxido de zinco de dimensões micro e à prevista por modelação.

A principal discussão científica em relação à segurança dos NMs de ZnO relaciona-se com a sua utilização nos protectores solares. A maioria das evidências sugerem que a aplicação dos NMs na pele não permitem a sua penetração nesta (Nohynek *et al.*, 2010). Por outro lado, embora se tenha suspeitado de que o ZnO poderia ser foto-genotóxico, i.e., genotóxico após activação pela luz ultra-violeta, alguns estudos demonstram que este efeito aparentemente não é devido ao ZnO em si mesmo (Dufour *et al.*, 2006).

Considerando a via de exposição oral, o NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) foi estabelecido como sendo 50 mg /kg de peso corporal por dia. Por sua vez, em ratos expostos intravenosamente, o NOAEL é de 1 mg/kg de peso corporal. De acordo com a NIOSH, os principais limites de exposição são: Pó total- TWA 15 mg/m^3 e Pó respirável- TWA 5 mg/m^3 .

Relativamente a genotoxicidade, a pesquisa bibliográfica permitiu identificar 18 artigos que descrevem 22 ensaios de genotoxicidade após ZnO, 3 dos quais realizados *in vivo*, que se resumem na Tabelas 20 e 21.

Tabela 20. Resumo dos principais resultados na literatura sobre a genotoxicidade do óxido de zinco *in vitro* e *in vivo*, onde não se observaram efeitos genotóxicos (negativos).

Referência	Nanomaterial	Sistema experimental
Hackenberg <i>et al.</i> , 2011b	ZnO (Sigma-Aldrich), 0.1 e 5 µg/ml	Ensaio do cometa em culturas de mini-órgão da mucosa nasal humana.
BASF SE, 2009 <i>cit. in</i> SCSS 2012	Z-COTE® HP1, 15- 60 mg/kg bw, i.p.	Ensaio do micronúcleo em medula óssea de ratinhos NMRI.
BASF SE, 2009 <i>cit. in</i> SCSS 2012	Z-COTE® Max (ZnO modificado com polímero de dimetoxidifenilsilane)	Ensaio de mutações em bactérias <i>Salmonella</i> .
L'Oreal, 2007, <i>cit. in</i> SCSS 2012	Zn com e sem foto-activação	Ensaio de aberrações cromossômicas em células de ovário de hamster chinês (CHO).
Shiseido, 2008 <i>cit. in</i> SCSS 2012	FINEX-50 ZnO (Sakai Chemical Industry Co.), aplicação tópica	Ensaio de foto- micronúcleo em ratinhos sem pelo HR-1
Nam <i>et al.</i> , 2012	ZnO, 0-100 µg/ml	Ensaio de mutação em bactérias (SOS chromotest)

Tabela 21. Resumo dos principais resultados na literatura sobre a genotoxicidade do óxido de zinco *in vitro* e *in vivo*, onde se observaram efeitos genotóxicos (positivos).

Referência	Nanomaterial	Sistema experimental
Alarifi <i>et al.</i> , 2013	ZnO (Sigma-Aldrich), 5-20 µg/ml, 24 e 48h de exposição	Ensaio do cometa em células de melanoma humano (A375).
Dufour <i>et al.</i> , 2006	Z-Cote (BASF AG), 500 µg/ml, com e sem fotoativação	Ensaio de aberrações cromossômicas em células de ovário de hamster chinês (CHO).
Gerloff <i>et al.</i> , 2009	ZnO nanoactive (Nanoscale Materials Inc.) e ZnO nanoscale (Nanostructured and Amorphous Materials Inc.) 20 e 80 µg/cm ² , 4 e 24h	Ensaio do cometa modificado com FPG, em células do epitélio intestinal humano (Caco-2).
Gümüş <i>et al.</i> , 2013	ZnO, 1- 20 µg/mL, 24 e 48h	Ensaio de aberrações cromossômicas e do micronúcleo em linfócitos humanos.
Hackenberg <i>et al.</i> , 2011b Osman <i>et al.</i> , 2010	ZnO (Sigma-Aldrich), 0.01 e 50 µg/ml ZnO	Ensaio do cometa em células da mucosa nasal humana. Ensaio do cometa e do micronúcleo células de carcinoma da laringe humano (HEp-2).
Gopalan <i>et al.</i> , 2009	ZnO (Sigma-Aldrich), com fotoativação, 11.5- 92.3 µg/ml	Ensaio do cometa em esperma humano e em linfócitos humanos.
Sharma <i>et al.</i> , 2012a Sharma <i>et al.</i> , 2011	ZnO (Sigma) ZnO	Ensaio do cometa em células de fígado (HepG2) Ensaio do cometa em queratinócitos epidérmicos humanos primários.
Valdiglesias <i>et al.</i> , 2013 Kumari <i>et al.</i> , 2011	ZnO (Sigma) ZnO (Sigma-Aldrich)	Ensaio do micronúcleo e ensaio do cometa em células neuronais humanas (SHSY5Y). Ensaio de micronúcleo e de aberrações cromossômicas em cebola (<i>Allium cepa</i>).
Sharma <i>et al.</i> , 2012a	ZnO (Sigma Chemical Co. Ltd.), 300 mg/kg, 14 dias	Ensaio do cometa em fígado de ratinhos albinos suíços.

Assim, dos 22 ensaios de genotoxicidade identificados, 72% indiciam efeitos genotóxicos, desde que ocorra a exposição do órgão alvo. Esse não é o caso quando estes NMs são aplicados na pele (SCCS, 2012) sendo alegadamente seguros por esta via, de acordo com o parecer do SCCS.

CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS GENÉTICOS DOS NANOMATERIAIS MANUFATURADOS

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é considerada uma *key enabling technology* impulsionadora do crescimento económico, devido ao seu potencial para melhorar a qualidade e desempenho de muitos tipos de produtos e de processos (Savolainen *et al.*, 2013). Por este motivo, verifica-se um crescente desenvolvimento, produção e aplicação em grande escala dos NMs bem como da sua utilização. Presentemente, a exposição da população humana a NMs, pode ser considerada ubiqüitária: tais partículas encontram-se no ar que respiramos e também nos produtos de consumo que utilizamos diariamente. Perante o inevitável aumento da exposição humana e a disseminação no ambiente, a avaliação seu potencial impacto constitui um novo desafio para a saúde pública. Este facto justifica a necessidade de realizar estudos que permitam garantir uma utilização segura dos nanomateriais, durante todo o seu ciclo de vida, protegendo o ambiente e a saúde humana.

Procurando responder a estas necessidades de conhecimento, em 2010 iniciou-se a Ação Concertada europeia “NANOGENOTOX- Safety Evaluation of Manufactured Nanomaterials by Characterisation of their potential Genotoxic Hazard”, Projecto co-financiado pela Executive Agency for Health and Consumers –EAHC e INSA; Grant agreement n°: 2009 2101 (www.NANOGENOTOX.eu). O projecto NANOGENOTOX pretendia colmatar a ausência de conhecimento científico e sustentar a evidência de ausência de riscos para a saúde ou alertar para potenciais riscos decorrentes dos produtos contendo NM, de modo a acrescentar valor às decisões regulamentares. Assim, esta Ação preconizava a avaliação de potenciais efeitos genéticos dos NMs designadamente através da utilização de NMs de referência, com uma adequada e completa caracterização físico-química e de metodologias optimizadas de dispersão desses nanomateriais, desenvolvidas e padronizadas no âmbito do projeto, para aplicação numa combinação de ensaios de genotoxicidade robustos e fiáveis.

Globalmente, esta Ação Concertada procurou gerar dados coerentes para uma adequada avaliação de segurança dos NMs. O presente estudo foi desenhado com ancoragem no NANOGENOTOX e a articulação com a Ação Concertada permitiu:

- Obter nanomateriais manufaturados de referência para o estudo, que tinham sido detalhadamente caracterizados nas suas propriedades físico-químicas;
- Conhecer *a priori* o comportamento dos NMs relativamente à sua dispersão nos meios de exposição;
- Utilizar um procedimento *standard* para a preparação dos NMs, garantindo a sua adequada dispersão nos meios de tratamento;
- Relacionar os resultados de genotoxicidade com os obtidos para os mesmos NMs, ou NMs do mesmo grupo, em outros laboratórios
- Conhecer a toxicocinética e bioacumulação nos tecidos de roedores, previamente à investigação a realizar *in vivo*.

2. OBJECTIVOS

Conforme foi descrito nas secções anteriores, verifica-se um incremento significativo no desenvolvimento, produção e utilização de nanomateriais manufacturados em produtos de consumo e em nanomedicina. Considerando que:

- os nanomateriais têm propriedades físico-químicas específicas, que condicionam a sua toxicologia;
- a exposição a nanomateriais manufacturados ocorre durante todo o ciclo de vida dos NM e estes encontram-se amplamente disseminados nos produtos de consumo humano e nanomedicina;
- os NM podem ter implicações na saúde humana e poderão relacionar-se com várias doenças, entre elas o cancro;
- os estudos de genotoxicidade descritos para os nanomateriais manufacturados são inconsistentes e muitos desses estudos não mimetizam adequadamente a exposição a NM nem as suas interacções nos sistemas biológicos;
- a informação sobre os mecanismos celulares e moleculares da genotoxicidade dos NM é escassa;
- não existe ainda um paradigma aplicável de um modo geral para a avaliação de risco dos nanomateriais e a regulamentação existente pode não ser aplicável a materiais com características tão distintas dos outros compostos químicos

Revela-se indispensável avaliar a segurança dos nanomateriais manufacturados e identificar possíveis riscos para a saúde para fundamentar, com base em evidência científica sólida, as decisões governamentais com vista a uma adequada regulamentação.

Neste contexto, o presente estudo tinha por objectivo principal caracterizar os efeitos genotóxicos associados com a exposição a nanomateriais manufacturados, de forma a contribuir para a avaliação da sua segurança.

Os NMs analisados pertencem a dois grupos de NMs amplamente utilizados em produtos de consumo, designadamente os NMs de dióxido de titânio (TiO₂) e os nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNTs).

Relativamente a estes NMs, os objectivos específicos do presente trabalho são:

1- Caracterizar a genotoxicidade dos NMs *in vitro* recorrendo a linhas celulares humanas, designadamente:

- i. Linfócitos humanos primários
- ii. Linha celular de epitélio brônquico humano (BEAS-2B)
- iii. Linha celular de adenocarcinoma epitelial de pulmão humano (A549).

2- Caracterizar a sua genotoxicidade *in vivo* através da utilização de um modelo de ratinho transgénico.

3- Investigar alguns mecanismos de acção subjacentes à genotoxicidade dos nanomateriais, nomeadamente:

- i. Contribuição de lesões oxidativas para a genotoxicidade induzida pelos NMs *in vitro*, nas células BEAS-2B e A549.
- ii. Bioacumulação *in vivo* e da localização celular dos nanomateriais.

3. QUESTÕES DE INVESTIGAÇÃO

Atendendo aos objectivos acima delineados, as hipóteses que o presente projecto procurou testar são enunciadas esquematicamente na Tabela 22.

Tabela 22. Hipóteses de investigação no âmbito desta dissertação.

Hipóteses de trabalho

H1: Os NMs produzem efeitos genotóxicos em células humanas (*in vitro*) de uma forma dependente da dose, ou seja, produzindo uma curva dose-resposta.

H2: Os NMs produzem efeitos genotóxicos em organismos (*in vivo*) e estes efeitos se correlacionam-se com os efeitos observados *in vitro*.

H3: A exposição de células humanas a NMs conduz à produção de espécies reactivas de oxigénio, e estas contribuem para a sua genotoxicidade.

H4: Após exposição *in vivo*, os NMs bioacumulam-se nas células e este efeito relaciona-se com a sua genotoxicidade *in vivo*.

De seguida descrevem-se as metodologias utilizadas para analisar a validade das hipóteses colocadas, de acordo com os objectivos descritos.

4. DESENHO DO ESTUDO

Os estudos *in vitro* e *in vivo* são utilizados de modo complementar na avaliação da genotoxicidade dos agentes exógenos. Deste modo, para o estudo das hipóteses descritas, o presente projecto foi planeado incluindo aquelas duas categorias de estudos, como se esquematiza na Figura 26.

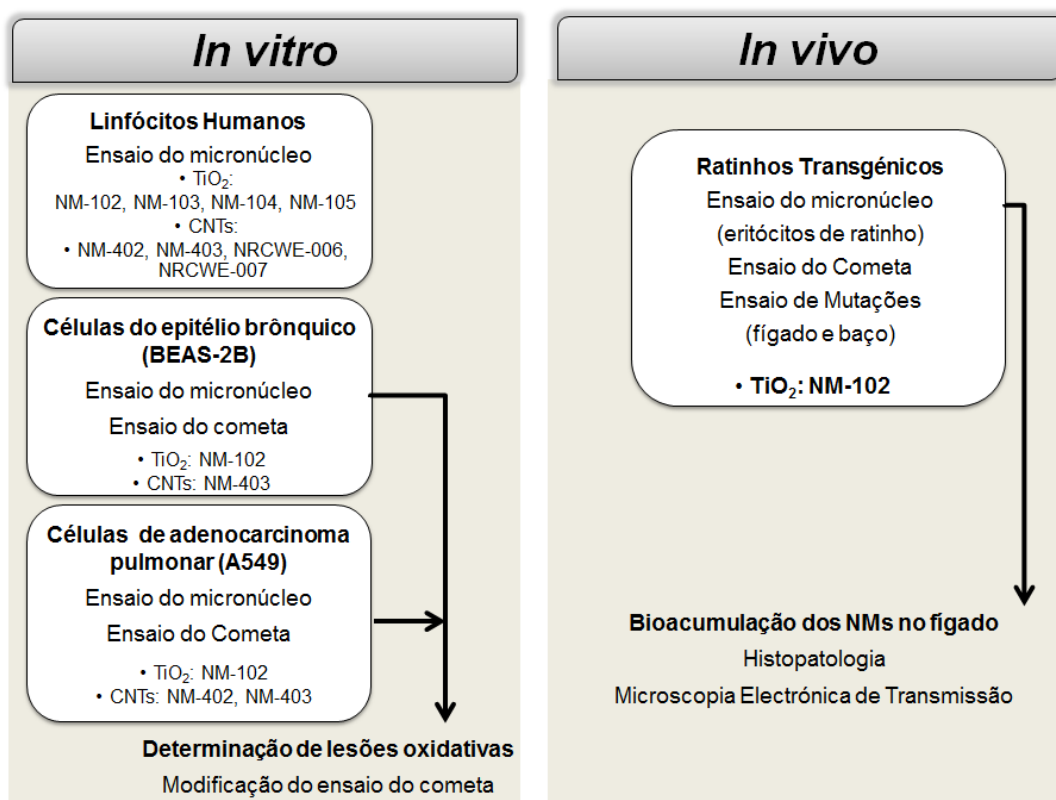


Figura 26. Delineamento experimental do estudo desenvolvido.

Inicialmente foram analisados os efeitos genotóxicos de quatro NMs de dióxido de titânio (NM-102, NM-103, NM-104 e NM-105) e quatro nanotubos de carbono de parede múltipla (NM-402, NM-403, NRCWE-006 e NRCWE-007) através do ensaio do micronúcleo em linfócitos humanos. Devido à impossibilidade de serem analisados todos os NMs nos vários sistemas experimentais (dentro do quadro temporal e financeiro desta tese), foi selecionado um NM de cada grupo (NM-102 e NM-403) para a análise de efeitos genotóxicos em células do trato respiratório (A549 e BEAS-2B) através do ensaio do micronúcleo e do cometa. Deste modo testou-se a hipótese H1.

Para os ensaios no modelo de ratinho transgénico foi seleccionado o NM-102, procurando deste modo verificar a hipótese H2. A selecção do NM a utilizar nos ensaios *in vivo* baseou-se essencialmente, na escolha de um NM analisado no âmbito do projeto NANOGENOTOX, cujos resultados não eram claros quanto à sua genotoxicidade *in vitro*. De entre os possíveis, procurou-se aquele que tivesse sido testado pelos vários grupos participantes, havendo já alguma informação relativamente à sua toxicocinética e toxicodinâmica, após a injeção por via intravenosa em ratos (NANOGENOTOX, 2013). Nesse sentido, foi seleccionado o NM de dióxido de titânio, NM-102, sobre o qual se sabia, designadamente, que:

- em células BEAS-2B e A549 ocorria um ligeiro efeito genotóxico após NM-102 (detetado no ensaio do cometa), bem como em queratinócitos e linfócitos (ensaio do micronúcleo);
- após injeção intravenosa de NM-102 em ratos Wistar, os resultados de toxicocinética indicam que ocorre acumulação elevada no fígado e baço, persistente por mais de 30 dias (de Jong *et al.*, 2013);
- em ratos expostos oralmente a 12.8 mg/kg de peso corporal houve um efeito genotóxico positivo, detectado no baço através do ensaio do cometa;
- os ratos expostos por instilação, 3 vezes, nas doses 1,15, 2,3 e 4,6 mg/kg apresentavam um aumento de micronúcleos na medula óssea.

A via de administração seleccionada baseou-se na observação de que no rato, a administração por via oral ou instilação não produziam acumulação nos órgãos alvo, pelo que dificilmente produziria efeitos. Em contraste, a via de administração intravenosa produziu acumulação de NMs nos órgãos (de Jong *et al.*, 2013), sendo retida no fígado cerca de 98% da dose administrada. Para além deste aspecto, esta via garantia 100% de biodisponibilidade sistémica, garantindo-se a exposição dos órgãos alvo.

Recorreu-se a uma abordagem integrativa *in vivo* em que vários parâmetros (*endpoints*) de genotoxicidade foram analisados em ratinhos. A combinação de vários níveis de informação a partir de cada animal permitiu reduzir o número de ratinhos necessários para a experimentação e possibilitou uma avaliação sistémica globalizante neste modelo.

Numa abordagem aos mecanismos de genotoxicidade, procurou-se averiguar a hipótese H3 através da análise das lesões oxidativas em células humanas e ainda a hipótese H4, através da análise histológica e citológica realizada no fígado de ratinhos expostos a NM-102.

5. AMOSTRA DO ESTUDO E DEFINIÇÃO DE VARIÁVEIS

O desenho descrito anteriormente corresponde a um estudo experimental em que a população deve ser entendida como o conjunto de células ou o grupo de ratinhos, que são expostos ou não a NMs. Assim, as células ou ratinhos que não foram expostos a NMs são consideradas como a referência, ou controlo negativo, uma vez que quaisquer efeitos biológicos neles detectados não podem ser atribuídos aos NMs. Os controlos negativos foram submetidos a todo o procedimento experimental, sendo utilizado para a exposição apenas o veículo em que o NM foi administrado.

Por outro lado, como garantia da capacidade do método experimental detectar lesões genotóxicas, foi ainda efectuada a comparação com células ou animais expostos a um agente, não nanométrico, reconhecidamente genotóxico, sendo este grupo designado como controlo positivo.

Assim, são de considerar em cada experiência, os resultados obtidos para três tipos de exposição:

- controlo negativo – exposto ao veículo;
- controlo positivo – exposto a agente reconhecidamente genotóxico, não nanométrico (e.g. mitomicina C, peróxido de hidrogénio, etc.)
- exposto a NMs (vários grupos expostos a várias doses de cada NM).

As questões a investigar prendem-se com dois aspectos estatísticos essenciais:

- Efetuar a comparação entre grupos de células ou animais expostos a determinada dose de um NM *versus* aqueles que não foram expostos e
- Analisar a existência de uma relação dose-resposta para cada nanomaterial estudado.

Considerando que o efeito que se pretende estudar é o nível de lesões no DNA observado numa população de células/ animais expostos a determinada dose, as variáveis em estudo são as determinações experimentais descritas na Tabela 23.

Tabela 23. Lista de variáveis em estudo.

Variáveis	Definição	Tipo	Escala	Forma de medição da variável
Concentração ou dose de nanomaterial	Independente	Quantitativa	Numérica contínua	-
Categoria de concentração ou dose de nanomaterial	Independente	Qualitativa	Categórica	-
Viabilidade celular	Dependente	Quantitativa	Numérica, contínua	Ensaio de viabilidade celular
Índice de Progressão do Ciclo Celular (CBPI)	Dependente	Quantitativa	Numérica, contínua	Ensaio do micronúcleo
Células micronucleadas	Dependente	Quantitativa	Numérica, discreta	Ensaio do micronúcleo
Quebras de cadeia simples e dupla no DNA e locais lábeis às bases	Dependente	Quantitativa	Numérica, contínua	Ensaio do Cometa
Mutações	Dependente	Quantitativa	Numérica, contínua	Ensaio de mutações no gene <i>LacZ</i>

Por conveniência da análise, para além da variável independente dose ou concentração, assumida como contínua, foi criada uma variável secundária, designada na tabela anterior por Categoria de dose ou concentração, em que a variável dose foi “categorizada” (em dose 1, dose 2, etc.) de modo a permitir a análise através de tabela de contingência no caso do ensaio do micronúcleo.

Nos ensaios realizados *in vitro*, a cultura de células (i.e., o frasco ou o poço de placa de cultura contendo inúmeras células) foi considerada como unidade experimental. Relativamente aos ensaios *in vivo*, o ratinho foi a unidade experimental, sendo analisados pelo menos 5 animais em cada grupo de exposição.

A dimensão da amostra para cada metodologia foi determinada com base na literatura em que foram aplicados os mesmos métodos experimentais, e considerando aceitável um valor de erro do tipo I (α) de 5% (Tabela 24).

Tabela 24. Fundamentação do estabelecimento da dimensão da amostra em estudo.

	Unidade experimental	Ensaio	Nº de réplicas (n)	Nº mínimo de células analisadas por réplica	Referência
In vitro	Cultura celular	Micronúcleo	≥ 2	1000	OECD, 2010
		Cometa	≥ 2	100	Collins <i>et al.</i> , 2008
In vivo	Ratinho	Micronúcleo	5	1000	OECD, 1997
		Cometa	5	100	EFSA, 2012
				100 000 por animal	Boerrigter; Vijg, 1997
		Mutações	5		OECD, 2013

Para a obtenção de resultados em células em cultura foram consideradas no mínimo duas réplicas, sendo analisadas 1000 células por réplica (OECD, 2010). Relativamente, às análises realizadas *in vivo*, foram considerados pelo menos 5 ratinhos em cada grupo de exposição (OECD, 1997).

Considerando este enquadramento estatístico, relativamente aos ensaios de micronúcleo e do cometa, os critérios de aceitabilidade de um resultado positivo basearam-se no aumento estatisticamente significativo em pelo menos duas concentrações ou aumento estatisticamente significativo na dose alta e uma relação dose-resposta (NANOGENOTOX, 2013). No caso de um aumento estatisticamente significativo em uma concentração, sem relação dose-resposta, os resultados foram considerados equívocos. Os restantes resultados foram considerados negativos.

No ensaio de mutações, o critério de resultado positivo foi uma dose-resposta estatisticamente significativa e/ou um aumento significativo em qualquer grupo de dose quando comparado com os controlos negativos (Heddle *et al.*, 2000). Um resultado positivo corresponderia assim a uma dose-resposta em combinação com pelo menos uma dose duas vezes superior aos controlos. Por sua vez, um resultado negativo é aquele que, não sendo estatisticamente significativo, apresenta uma média de frequência de mutantes em todas as doses inferiores a dois desvios padrões da média de frequência de mutantes dos controlos negativos (OECD, 2009).

6. METODOLOGIAS

6.1. Nanomateriais manufacturados analisados

Todos os NMs selecionados para este estudo, excepto dois, foram fornecidos pelo Joint Research Centre (JRC; Ispra, Itália). Os NMs foram preparados sob as normas de boas práticas laboratoriais (Good Laboratory Practices; GLP) permitindo a sua aplicação como referências internacionais (http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/nanotechnology/nanomaterials-repository). Por sua vez, os NMs designados por NRCWE-006 (Mitsui&Co Ltd, Ibaraki, Japan) e NRCWE-007 (Cheap Tubes Inc., Brattleboro, VT, USA) foram fornecidos como sub-amostras pelo Centro Nacional de Investigação para o Ambiente e Trabalho (National Research Centre for the Working and Environment, NRCWE; Copenhaga, Dinamarca).

Foram estudados quatro NMs de dióxido de titânio (NM-102, NM-103, NM-104 e NM-105) e quatro nanotubos de carbono de parede múltipla (NM-402, NM-403, NRCWE-006 e NRCWE-007).

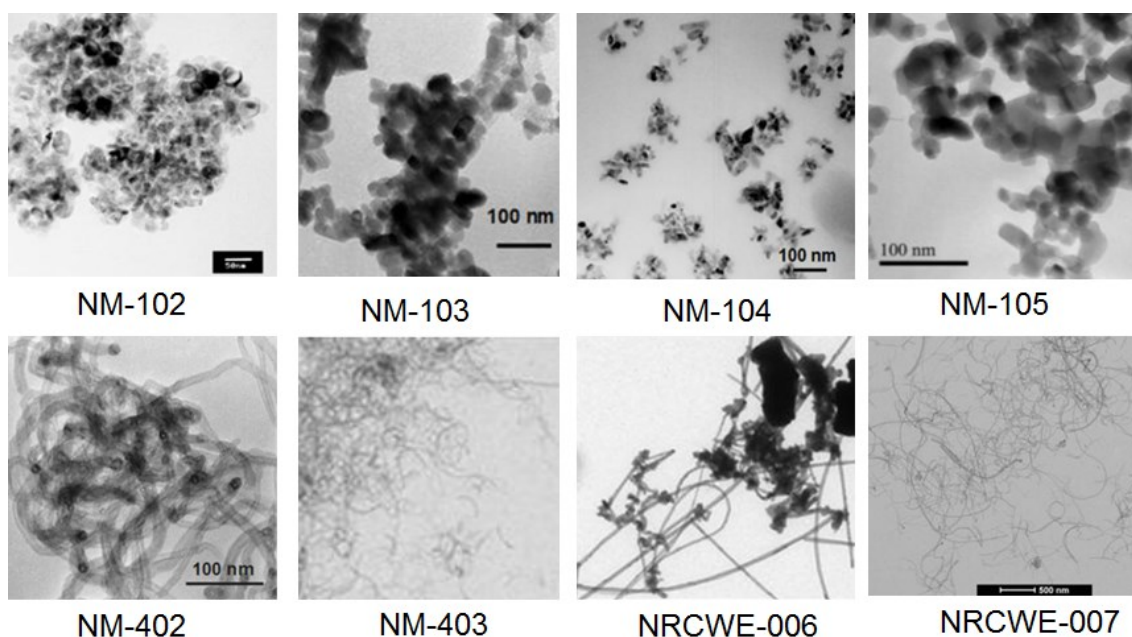


Figura 27. Os nanomateriais selecionados para este trabalho. Microfotografias da sua estrutura obtidas por microscopia de transmissão electrónica (NANOGENOTOX Joint Action, 2013).

O óxido de zinco (NM-110, JRC) foi utilizado como um candidato a controlo positivo nanométrico, uma vez que foi demonstrado ser genotóxico em algumas células humanas (Hackenberg *et al.*, 2011a).

A dimensão (distribuição) das partículas primárias é o critério fundamental na definição do que é um nanomaterial e pode ser determinado através de vários métodos diferentes, tais como difração de raios-X (XRD), microscopia electrónica de transmissão (TEM) ou inferida através de *dynamic light scattering* (DLS). No âmbito do projeto NANOGENOTOX, a morfologia e dimensões dos NMs em estudo foram determinadas por outros participantes e apresentam-se nas Tabelas seguintes.

Tabela 25. Características de diâmetro (Feret) e proporções típicas de vários NMs de dióxido de titânio e óxido de zinco.

NM	Fase cristalina	Impurezas/ Modificações de Superfície	Área superficial específica (m ² /g) ^a	Partículas Primárias			Aglomerados (dimensão média, nm)
				Diâmetro min. ± DP (nm)	Diâmetro máx. ± DP (nm)	Razão de aspeto ± DP	
NM-102	Anatase	-	78	20.8 ± 1.6	33.0 ± 1.5	1.5 ± 1.3	54
NM-103	Rutilo (hidrofóbico)	Dimeticone 2%	51	21.9 ± 1.4	37.9 ± 1.6	1.7 ± 1.3	67
NM-104	Rutilo (hidrofílico)	Glicerina	56	19.0 ± 1.5	25.8 ± 1.4	1.4 ± 1.3	60
NM-105	Rutilo-anatase	Nenhum	46	20.0 ± 1.3	29.6 ± 1.3	1.4 ± 1.2	90
NM-110		Não revestido		37.1 ± 1.3	56.3 ± 1.4	1.4 ± 1.2	149

^aNANOGENOTOX, 2013. Razão de aspeto - razão entre a altura e a largura. Informação detalhada publicada em Tavares *et al.*, 2013.

Tabela 26. Características dos nanotubos de carbono de parede múltipla, CNT.

NM	Fase cristalina	Área superficial específica (m ² /g) ^a	Razão de aspeto ± DP	Espessura ± SD (nm)	Comprimento Geodésico ± SD (nm)
NM-402	MWCNT	226	107.1 ± 1.9	10.7 ± 1.3	1141.3 ± 2.0
NM-403	MWCNT	135	35.6 ± 1.8	11.1 ± 1.5	394.3 ± 1.6
NRCWE-006	MWCNT	26	63.7 ± 2.4	69.4 ± 1.4	4423.6 ± 2.3
NRCWE-007	MWCNT	96	24.1 ± 1.9	15.3 ± 1.5	368.7 ± 2.0

^aNANOGENOTOX, 2013. Razão de aspeto - razão entre a altura e a largura. Informação detalhada publicada em Tavares *et al.*, 2013.

Verificou-se que as médias geométricas, i.e., Feret Min, das partículas primárias de todos os materiais de TiO₂ e ZnO analisados eram muito inferiores a 100 nm, confirmando que se qualificam como NMs, de acordo com a definição da UE. As partículas primárias de TiO₂ e ZnO apresentavam uma razão de aspeto semelhante (cerca de 1,5), correspondente a elevada esfericidade, com morfologia poliédrica. Por sua vez, os nanotubos de carbono apresentavam uma razão de aspeto muito mais elevada, que permite classificá-los como fibras. Verificou-se ainda que estes últimos consistem em tubos flexíveis com um baixo número de paredes, excepto o NRCWE-006, que tem pouca flexibilidade e é constituído por elevado número de paredes.

Como foi referido, no âmbito do projeto NANOGENOTOX, foi desenvolvido e otimizado um procedimento que permite a dispersão estável dos NMs utilizados no presente estudo (Jensen *et al.*, 2011), que se descreve de seguida. Seguindo este procedimento laboratorial para cada NM, antes de cada ensaio, foi preparada uma dispersão com a concentração de 2.56 mg/ml. Para esse fim, após a pesagem do NM em pó, foi adicionado 0.5 % do seu volume de etanol (96%) e de seguida albumina de soro bovino (0.05 %, *bovine serum albumin*, BSA; Sigma) previamente esterilizada por filtração. A dispersão foi conseguida através da ultra-sonicação com sonda de 13 mm, durante 16 min, a 400 W, 10 % de amplitude (Figura 27).



Figura 28. Exemplo de dispersão de um NM: após a pesagem e ressuspensão de um NTC, este foi submetido a ultrasonicação com sonda, resultando numa dispersão visivelmente homogênea.

A efetiva dispersão de cada um destes NMs, preparados utilizando o protocolo descrito na Figura 27, foi verificada por outros participantes do projeto NANOGENOTOX, através do método de DLS. Na dispersão preparada de acordo com este método, todos os TiO_2 apresentavam um pico entre os 78.8 e 122.4 nm. Para o ZnO verificou-se um pico de 190 nm e um pico secundário na ordem dos nanómetros, claramente superior ao TiO_2 . No caso dos NTCs, embora o significado das medições de DLS seja menos claro, verificou-se que a dispersão foi eficaz. Globalmente obtiveram-se com sucesso partículas de dimensões nanométricas, mas também eram detectáveis alguns aglomerados em meio aquoso após a dispersão dos NMs. De acordo com o procedimento realizado, as dispersões mostraram-se estáveis durante cerca de 1 hora (Jensen *et al.*, 2011) e a exposição das células ou dos ratinhos foi realizada nesse intervalo de tempo.

Por sua vez, a estabilidade das dispersões de NMs em meio de cultura foi verificada, conforme descrito para o meio RPMI.

A selecção das concentrações a testar baseou-se, de uma forma geral, nas recomendações da OECD (OECD, 2010), designadamente:

- a concentração mais elevada deve produzir cerca de 50% de citotoxicidade, uma vez que níveis mais elevados podem induzir lesões cromossómicas como efeito secundário do processo de morte celular (item 28, OECD, 2010)
- quando a solubilidade é um fator limitante, a concentração máxima (se não fôr limitada pela citotoxicidade) deve ser a concentração mais baixa em que é visível o mínimo precipitado, que não interfira na observação (item 30)
- se não se verificar citotoxicidade ou precipitado, a concentração mais elevada deve corresponder a 0.01 M, 5 mg/mL ou 5 µl/mL, a que fôr mais baixa (item 29).

Assim, com base em ensaios preliminares em que se ponderaram estes aspectos, as concentrações de NMs utilizadas para a exposição das células foram entre 2.5 e 256 µg/ml sendo principalmente limitadas pela qualidade da dispersão em meio aquoso (2,56 mg/ml para a maioria dos NMs). Em alguns tipos celulares, a citotoxicidade foi também fator determinante (por exemplo, no caso do NM-110 em células BEAS-2B). Assim, apenas quando a qualidade da dispersão parecia satisfatória, os NMs foram testados até à concentração máxima que permitia a análise microscópica adequada.

6.2. Caracterização de genotoxicidade dos NMs *in vitro*

6.2.1. Linhas celulares e sua exposição aos nanomateriais

No âmbito deste estudo, os linfócitos humanos foram utilizados como modelo de células humanas não imortalizadas, i.e., primárias. Devido aos extensos dados existentes na literatura sobre o ensaio de micronúcleo neste tipo celular, os resultados obtidos permitem comparabilidade com outros agentes potencialmente genotóxicos (OECD, 2010). Para a cultura de linfócitos, o sangue total foi obtido de doadores saudáveis, jovens, não fumadores e que não tinham sido submetidos a irradiação recentemente, conforme preconizado nas orientações para a realização do ensaio do micronúcleo em linfócitos humanos (OECD, 2010).

Recorreu-se também à utilização de duas linhas celulares do trato respiratório, A549 e BEAS-2B. A escolha destas células deve-se ao facto da via respiratória ser uma via de exposição provável para os NMs, especialmente em contexto ocupacional. As células A549 (ATCC, Manassas, VA, USA) derivam de adenocarcinoma epitelial de pulmão humano (Foster *et al.*, 1998). Por outro lado, as células BEAS-2B (ATCC), não tumorigénicas, têm origem no epitélio brônquico humano, transformado por Adenovirus-12 SV40 (Atsuta *et al.*, 1997). Possuem atividade de metabolização (P450-1A1, P450-1B6, CYP1A1 e CYP1B6 funcionais).

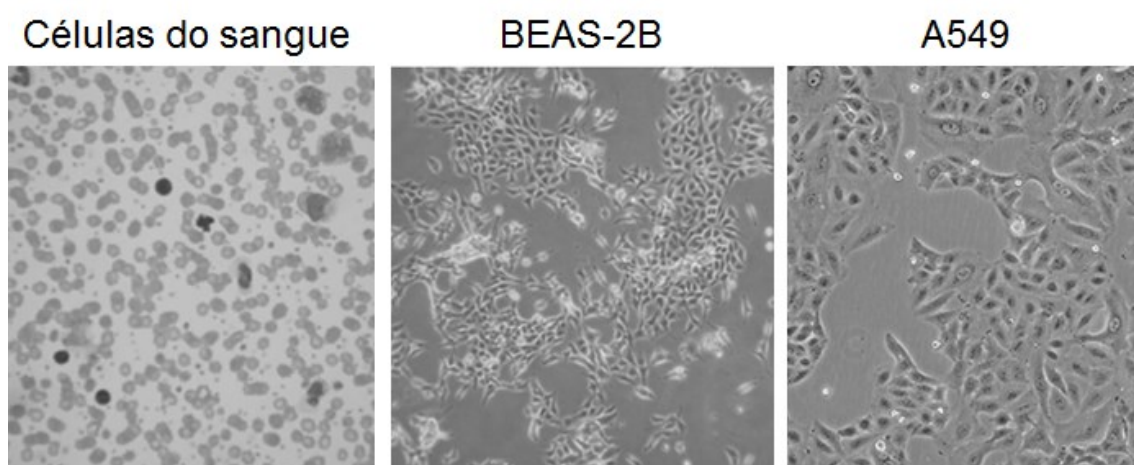


Figura 29. Microfotografia das células em cultura: sangue total em culturas primárias, linha celular BEAS-2B e A549.

Todos os meios de cultura e suplementos utilizados eram da Gibco-Invitrogen (Carlsbad, CA), salvo indicação em contrário.

Para a cultura celular de linfócitos primários, cerca de 500 µl de sangue, obtido dos dadores foram incubados em frascos de cultura celular de 25 cm² com meio RPMI-1640 com Glutamax, suplementado com 15% de soro bovino fetal, 1.5% de penicilina-estreptomicina (Gibco, 10000 U/ml), 2,5% de tampão HEPES, 0.5% heparina (BBraun) e 2,5% de fitohemaglutinina (Life Technologies). A exposição realizou-se 38h após o início da cultura.

A cultura das células A549 foi realizada em meio DMEM com 10% de soro bovino fetal inactivado (Hyclone, Cramlington, Northumberland, Grã-Bretanha), 1% de penicilina-estreptomicina, 2,5% de tampão HEPES e 1% de fungizona 0,25 mg/ml.

Para a cultura das células BEAS-2B, foi utilizado o meio BEGM isento de soro, constituído por Bronchial Epithelial Cell Basal Medium (BEBM) e suplementos (Lonza, Walkersville, MD).

No caso das células A549 e BEAS-2B a exposição ocorreu 24h após o início da cultura (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha).

As células em fase de crescimento exponencial foram expostas aos NMs, 6h antes da adição de 5 µg/ml de citocalasina B para o bloqueio da citocinese (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Para cada condição de tratamento foram realizadas pelo menos 2 culturas como réplicas e todas as experiências incluíram os seguintes controlos: mitomicina C, 0.170 µg/ml (MMC; Sigma-Aldrich) e NM-110 (20 ou 64 µg/ml) como controlos positivos e o meio de dispersão como controlo do solvente (BSA 0,05%, controlo negativo).

6.2.2. Ensaio de citotoxicidade em linhas celulares

Concomitantemente com os ensaios de genotoxicidade é geralmente recomendado conduzir-se ensaios de morte celular ou citotoxicidade (OECD, 2010). Esta recomendação baseia-se na observação de que um elevado nível de lesões genómicas pode conduzir à morte celular, evitando que as lesões sejam detetadas nos ensaios de genotoxicidade. Para evitar resultados falsamente negativos, a informação sobre a citotoxicidade deve ser considerada.

A forma mais simples de averiguar o impacto dos agentes em estudo na citotoxicidade é o ensaio de viabilidade celular com azul de tripano. Neste ensaio é avaliada a capacidade das células viáveis excluírem o corante, sendo impermeáveis ao corante, enquanto as células cujas propriedades de membrana se encontram alteradas, o deixam penetrar, adquirindo coloração azul (Longo-Sorbello *et al.*, 2006). No entanto este procedimento não é aplicável a contagens de linfócitos nas culturas primárias de sangue devido aos vários tipos celulares presentes que dificultam a análise.

Este método foi utilizado nas células BEAS-2B e A549 expostas aos NMs. Estas foram desagregadas utilizando tripsina-EDTA e uma alíquota de 50 µl foi adicionada a 50 µl de solução de azul de tripano 0,4% (Gibco). As células foram transferidas para uma câmara de Neubauer para a sua contagem. Após a contagem de células, calculou-se a concentração de células viáveis e inviáveis em cada cultura, considerando a diluição efetuada. A comparação da viabilidade celular nas culturas expostas ao NM com a das culturas não expostas permitiu aferir qual a alteração da viabilidade devida ao tratamento.

Um outro ensaio de citotoxicidade frequentemente utilizado é o ensaio do vermelho neutro e baseia-se na capacidade das células viáveis incorporarem o corante vermelho neutro nos seus lisossomas (Repetto et al., 2008). Para esse fim, as células A549 foram cultivadas em placas de 96 poços e expostas aos NMs durante 24h, sendo adicionado meio contendo vermelho neutro a 50 µg/ml (NR, Merck) no final do tempo de exposição e incubadas por mais 3h para permitir a incorporação do corante. Após a lavagem das células para remoção do corante não incorporado, foi adicionada solução STOP (ethanol:ácido acético: água, 50:49:1) para extrair o NR das células em que tinha sido incorporado. Depois de agitação por 20 minutos, a quantidade de NR presente em solução foi medida espectrofotometricamente a 540 nm, utilizando um espectrometro Multiscan Ascent (Thermo Labsystems, Dreieich, Alemanha). Assumindo a absorvância das células não expostas como o valor de 100%, a viabilidade relativa das células expostas foi determinada pela fórmula:

$$\text{Viabilidade celular relativa} = \frac{\text{Média da Abs540}_{\text{expostas}}}{\text{Média da Abs540}_{\text{não expostas}}} \times 100$$

No presente trabalho, o ensaio do vermelho neutro foi utilizado em A549 expostas aos NTCs sem sucesso, tendo-se verificado que os NMs, ao aglomerarem sobre as células, inviabilizavam a sua aplicação por interferirem na leitura espectrofotométrica. Apenas no caso do ZnO foi possível obter medições consistentes utilizando esta metodologia.

Como alternativa ao ensaio do vermelho neutro, recorreu-se ao ensaio clonogénico. Fundamenta-se na capacidade de uma célula isolada formar colónias, definidas como contendo mais de 50 células (Longo-Sorbello *et al.*, 2006). No caso das células A549 expostas a NTCs, revelou-se um método adequado para a quantificação da sobrevivência celular *in situ* (Herzog *et al.*, 2007). Assim, no estudo presente as células foram diluídas de modo a colocar 250 células em cada poço de uma placa de 6 poços (Sarstedt). Permitiu-se a incubação para as células aderirem, durante um período de tempo de 14 horas (inferior ao tempo de duplicação da linha celular) e realizou-se a exposição aos NMs. Depois de 8 dias, procedeu-se à lavagem das células e sua fixação com metanol absoluto frio (Sigma). Seguiu-se a coloração com 10% Giemsa (Merck) em tampão fosfatos Gurr (Merck) e a contagem do número de colónias que se formadas.

A eficiência de clonagem (EP) foi determinada segundo a equação:

$$\text{Eficiência de clonagem (EP)} = 100 \times \frac{\text{no. colónias formadas}}{\text{no. de células plaqueadas}}$$

A fracção sobrevivente (FS, *surviving fraction*) foi calculada para cada dose de exposição de acordo com a equação:

$$FS = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ colónias formadas após exposição}}{\frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células plaqueadas} \times EP}{100}}$$

Deste modo, utilizando o ensaio clonogénico, a citotoxicidade pode ser determinada como a diminuição da fracção sobrevivente em relação controlo negativo.

6.2.3. O ensaio do micronúcleo *in vitro*

O ensaio do micronúcleo *in vitro* com bloqueio da citocinese foi realizado de acordo com a linha orientadora da OECD (OECD, 2010). Após a exposição das células em fase de crescimento exponencial aos NMs, as culturas foram incubadas para permitir a internalização destes antes da adição de citocalasina (Gonzalez *et al.*, 2011). Paralelamente, uma cultura de células foi exposta ao veículo apenas (água com 0.05 % de BSA; controlo negativo) enquanto outra foi exposta a mitomicina C (MMC; controlo positivo). Seis horas depois adicionou-se 5 µg/ml de citocalasina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para bloqueio da citocinese. Prosseguiu-se a incubação por mais 42h (A549, BEAS-2B) ou por mais 24h (linfócitos), conforme indicado na Figura 30.

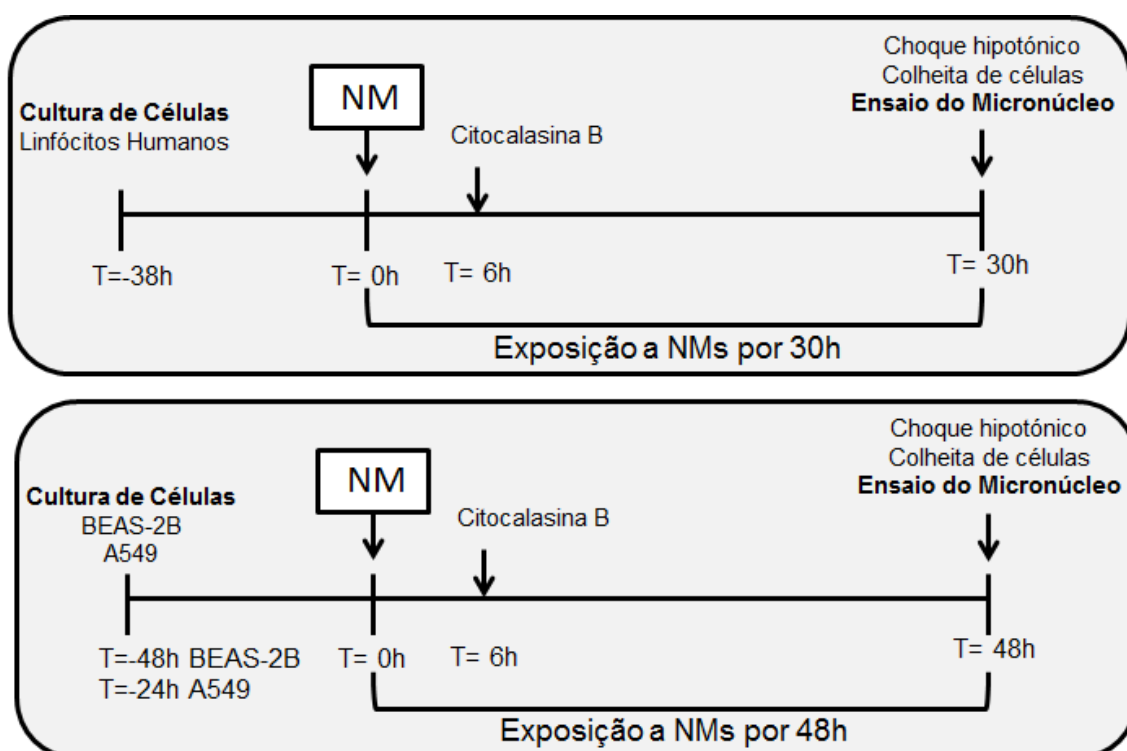


Figura 30. Representação esquemática da exposição das células aos NMs e do procedimento do ensaio do micronúcleo.

No final do período de exposição procedeu-se à colheita das células, através do tratamento com solução hipotónica (água: DMEM (3:1) ou KCl 0.1 M), seguida de fixação em metanol: ácido acético (3:1; Sigma). As células foram imediatamente espalhadas em lâmina e secas ao ar antes de serem coradas.

As lâminas das células BEAS-2B foram coradas com solução de laranja de acridina (32 µg/ml; Sigma-Aldrich) e lavadas por 3 vezes em tampão Sörensen. Finalmente foram coradas com 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI, 5 µg/ml Sigma-Aldrich) por 5 minutos, lavadas em água e montadas com umas gotas de Sörensen.

As lâminas das células A549 e dos linfócitos foram coradas utilizando o corante de Giemsa (Merck, Darmstadt, Germany) a 4%, lavadas em tampão Gurr (Merck) e foram montadas com 2-3 gotas de meio de montagem Entellan (Merck).

Após a coloração e montagem, as lâminas foram codificadas para garantir a isenção do observador e observadas em microscopia ótica com uma ampliação de 40x ou 100x. A frequência de células micronucleadas foi determinada em, pelo menos, 2000 células binucleadas e 1000 mononucleadas provenientes de duas culturas independentes. Adicionalmente, a proporção de células mono- (MC), bi- (BC) ou multinucleadas (MTC) num total de 1000 células foi determinada recorrendo a uma ampliação de 40x, permitindo calcular o índice de proliferação celular após bloqueio da

citocinese (CBPI), com base no número de células mono- (MC), bi- (BC) ou multinucleadas (MTC), de acordo com a fórmula (OECD, 2010):

$$CBPI = \frac{MC + 2BC + 3MTC}{\text{Total de células}}$$

O CBPI indica o número médio de ciclos celulares por célula durante o período de exposição à citocalasina B.

Também foi calculado o índice de replicação (RI) das culturas que indica o número relativo de núcleos nas culturas expostas aos NMs em comparação com as culturas de controlo negativo, utilizando a fórmula:

$$RI = 100 \times \frac{\left[\frac{BC + 2MTC}{\text{Total de células}} \right]_{\text{expostas}}}{\left[\frac{BC + 2MTC}{\text{Total de Células}} \right]_{\text{não expostas}}}$$

6.2.4. O ensaio do cometa *in vitro*

Para o ensaio do cometa nas linhas celulares, recorreu-se a um tempo de exposição de 24h, de acordo com a Figura 31:

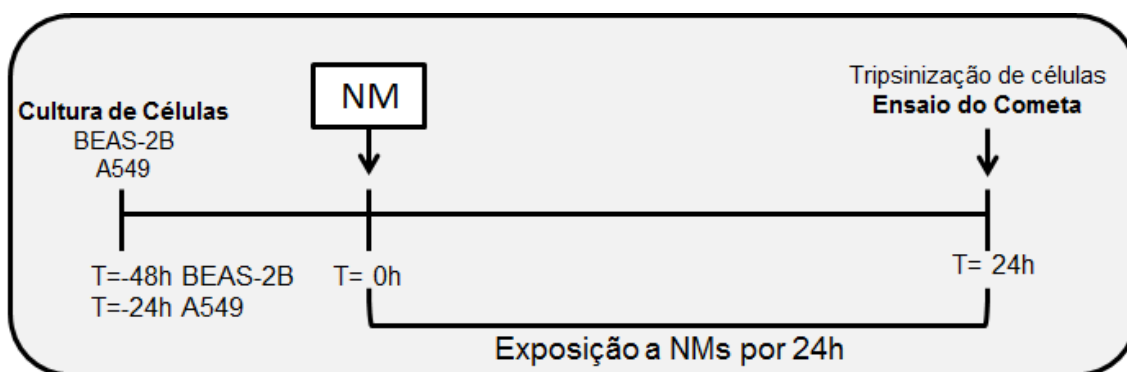


Figura 31. Representação esquemática da exposição das células aos NMs e do procedimento do ensaio do cometa.

Como controlo negativo foi utilizado para a exposição das células o veículo (BSA 0.05 %) e como controlo positivo foi utilizado o agente químico sulfonato de etilmetano (EMS, Sigma) na concentração de 0,75 mM.

Após a exposição, as células foram desagregadas por tripsinização. Cerca de 1×10^4 células foram adicionados a 300 μ l agarose de baixo ponto de fusão, a 38°C (0,8%; Sigma). Em cada lâmina, pré-revestida com agarose 1%, foram aplicadas duas gotas de 35 μ l desta mistura, colocando-se sobre estas lamelas quadradas 20 x 20 mm. De seguida as lâminas foram submersas em solução de lise (2,5 M NaCl; 100 mM Na₂EDTA.2H₂O; 10mM Tris-HCl ; pH10; 1% N-laurosilsarcosina; 10 % de DMSO e 1% Triton X-100), a 4°C por 1h-16h.

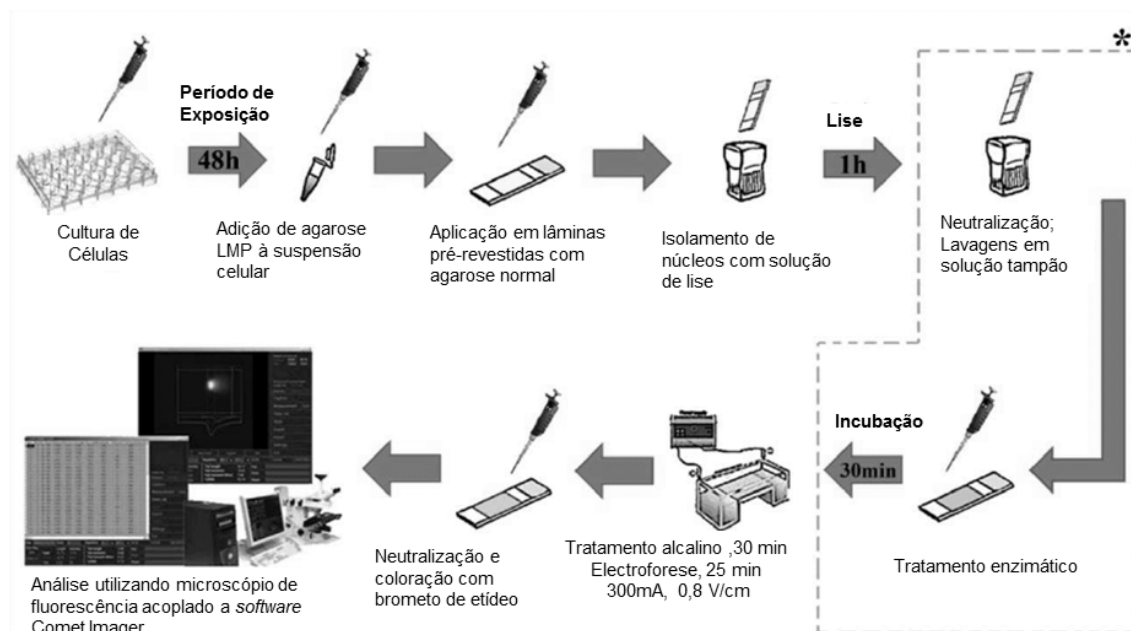


Figura 32. Representação esquemática do procedimento do ensaio do cometa (adaptado de Pinto, M.; 2011). *O passo envolvendo o tratamento enzimático é opcional, e foi realizado para a investigação de lesões oxidativas do DNA.

Após a lise, as lâminas foram lavadas em tampão de neutralização (0,4 M Trizma base; 4 M HCl, pH7,5) e, no caso de se proceder ao tratamento enzimático opcional, foram lavadas por 3 vezes com o tampão do enzima (HEPES, 40 mM; KCl 100 mM; EDTA 0,5 mM; BSA 0,2 mg/ml) e incubadas com enzima FPG (gentilmente oferecida pelo Dr. A.R. Collins, Universidade de Oslo, Noruega) ou com tampão da enzima apenas (controlo negativo da reacção enzimática), por 30 minutos a 37°C em câmara húmida. O passo envolvendo o tratamento enzimático foi realizado para a investigação de mecanismos de ação celulares, apresentados em secção dedicada a esse aspeto.

De seguida, as lâminas foram desnaturadas durante 30 minutos a 4°C (NaOH 300 mM; Na₂EDTA*2H₂O 1 mM). A electroforese decorreu a 0.8V/cm a 300 mA, por 25 minutos, as lâminas foram lavadas 10 minutos com tampão de neutralização e água, sendo finalmente secas ao ar, protegidas da luz, até à coloração com 18 µl de brometo de etídeo.

Para quantificar a migração do DNA, foram analisados com um microscópio de fluorescência (Zeiss, Axioplan 2) e uma objectiva de 20x, acoplado a câmara de elevada resolução (Metafer 4, Metasystems) 50 cometas em cada microgel, i.e., 100 por cada cultura. Utilizando o sistema de análise de imagem Comet Imager (MetaSystems, GmbH), é possível distinguir a “cabeça” do cometa e a sua “cauda” (Figura 21) e medir vários parâmetros incluindo o comprimento da cauda, a percentagem total de fluorescência na cauda e na cabeça e o momento da cauda. As grandezas como o comprimento da cauda (*tail lenght*), a dimensão da cabeça (*head size*) e o comprimento total (*total lenght*) são medidos em unidades de comprimento (micrómetros) enquanto outras, tais como a Intensidade da cabeça (*head intensity*) ou Intensidade da cauda (*tail intensity*) derivam de quantificações da fluorescência emitida. Por sua vez, os valores do momento da cauda, momento da cauda *olive* ou percentagem de DNA na cauda correspondem a cálculos matemáticos tomando por base os valores medidos. Assim, por exemplo o momento da cauda é calculado como o produto do comprimento da cauda e a intensidade relativa desta. A percentagem de DNA na cauda relaciona-se linearmente com a frequência de quebras de DNA na cauda (Dusinska; Collins, 2008; Tice *et al.*, 2000).

6.3. Determinação de lesões oxidativas induzidas pelos NMs *in vitro*

Como vimos, a modificação do ensaio do cometa através da aplicação de endonucleases específicas para determinadas lesões no DNA permite, por exemplo, quantificar as lesões oxidativas (Collins, 2008; Johansson *et al.*, 2010). No presente trabalho, esta análise foi efetuada com o objectivo de avaliar a contribuição das lesões oxidativas para eventuais efeitos genotóxico dos NMs. Assim, a experiência realizada nas células BEAS-2B, com um NM de cada classe, foi repetida para incorporar no ensaio do cometa a modificação com a enzima FPG, de acordo com o esquema

experimental delineado na anteriormente, mas recorrendo a agarose de baixo ponto de fusão a 1%.

Os microgeis expostos a FPG indicam o nível de quebras na cadeia de DNA e as bases oxidadas (SB + OX) enquanto os microgeis não expostos a enzima indicam apenas as quebras (SB). Assumindo uma relação dose-resposta linear quando considerando os valores de percentagem de DNA na cauda ou as unidades arbitrárias, as pirimidinas oxidadas ou purinas alteradas são determinadas pela equação:

$$\text{Lesões oxidativas} = (\text{SB} + \text{OX}) - \text{SB}$$

A comparação das lesões oxidativas nas células expostas aos NMs com as células não expostas permite aferir a contribuição deste tipo de lesões para o efeito observado, aumentando também a sensibilidade do ensaio do cometa a eventuais efeitos genotóxicos dos NMs.

6.4. Caracterização de genotoxicidade dos NMs *in vivo*

6.4.1. Exposição dos Ratinhos *LacZ*

Uma vez concluída a avaliação da genotoxicidade *in vitro*, foi seleccionado um nanomaterial para testar *in vivo*, de acordo com os critérios descritos no desenho do estudo.

O modelo experimental utilizado para os ensaios *in vivo* foi o ratinho transgénico baseado em plasmídeo contendo o gene *LacZ*. Foram utilizados animais da espécie *Mus musculus*, vulgarmente designados por murganho ou ratinhos. A estirpe utilizada (C57BL/6J) foi desenvolvida por Jan Gossen com a introdução do plasmídeo pUR288 como transgene, e foi por ele gentilmente cedida ao INSA há vários anos (Gossen *et al.*, 1989). Assim, todos os animais envolvidos neste estudo foram criados e mantidos no Biotério do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, de acordo com as directivas nacionais e internacionais vigentes (Comissão Europeia, 2010; 1986; Decreto-Lei n.º 129/92, Portaria n.º 1005/92).

O NM para este estudo foi preparado recorrendo ao mesmo procedimento descrito para os ensaios *in vitro*. Assim, foi preparada uma suspensão de NM-102 em solução aquosa de BSA 0,05% e procedeu-se à sua sonicação. À dispersão obtida, na

concentração de 2,56 mg/ml, foi de seguida adicionado tampão fosfato salino concentrado (PBS 10x, Invitrogen-Gibco) de modo a ficar 1x concentrado na solução final. Como controlo negativo utilizou-se uma preparação equivalente (solução aquosa de BSA 0,05%). Estas dispersões foram injectadas por via intravenosa na veia lateral da cauda dos ratinhos, em dois dias consecutivos. Finalmente, como controlo positivo foi escolhida a etil-nitrosureia (ENU, Sigma-Aldrich), já utilizado anteriormente neste modelo (Louro *et al.*, 2010). O controlo positivo foi preparado por dissolução em dimetilsulfóxido (Sigma) e posterior diluição 1:4 em PBS para uma concentração final de 25 mg/ml, que foi injectada por via intraperitoneal nos ratinhos. Esta via de administração foi escolhida para permitir comparação com os resultados obtidos anteriormente (Louro *et al.*, 2010).

Para a exposição escolheram-se ratinhos machos, com 12-14 semanas de idade, que foram aleatoriamente distribuídos pelos grupos de tratamento descritos na Tabela 27.

Tabela 27. Descrição dos grupos de exposição no ensaio *in vivo*.

Exposição	Via de administração	Número de administrações	Número de ratinhos
Controlo Negativo	Intravenosa	2	5
NM-102- 10 mg/kg	Intravenosa	2	5
NM-102- 15 mg/kg	Intravenosa	2	6
Etil-Nitrosureia- 120 mg/kg	Intraperitoneal	1	5
Total			21

Para cada injeção, foram preparadas dispersões do NM imediatamente antes da administração. A Figura 33 representa o esquema de exposição utilizado.

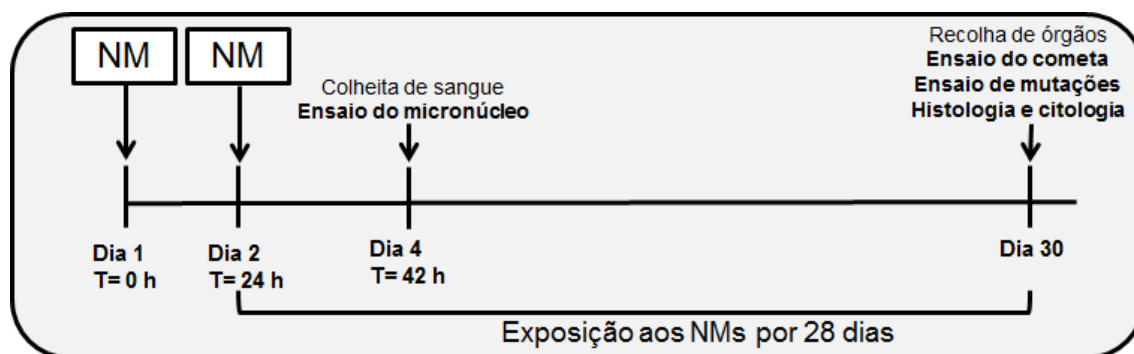


Figura 33. Representação esquemática da exposição e colheita de amostras no ensaio em ratinhos.

Durante o período de expressão de mutações, o peso dos ratinhos foi monitorizado para verificação de alguma evidência de toxicidade, que não se observou, como se pode ver na Tabela em Apêndice (Apêndice V). A variação do peso individual foi positiva, ou seja, houve um aumento de peso desde o início da exposição até ao sacrifício em todos os animais. No entanto, no dia do sacrifício para recolha dos órgãos dos ratinhos verificou-se que no caso dos controlos positivos havia uma evidente atrofia testicular em todos os ratinhos expostos ao ENU.

Após sacrifício por deslocamento cervical, os órgãos para os estudos subsequentes foram removidos para tampão fosfato salino a 4°C. Recolheu-se o lóbulo esquerdo do fígado, o baço e os testículos. Cerca de 1/3 do fígado, do baço e os testículos foram congelados rapidamente em azoto líquido e posteriormente armazenados a -80°C para análise de mutações. Uma parte do fígado e do baço foi utilizada imediatamente para o ensaio do cometa e uma pequena porção foi colocada em solução de fixação de glutaraldeído (2.5% glutaraldeído em 0.1 M cacodilato de sódio, pH 7.4) para microscopia electrónica de transmissão. Finalmente, uma porção do fígado foi fixada em formol 10% tamponado para análise histopatológica posterior. Ao fim de 24h esta solução foi removida e substituída por solução fresca.

6.4.2. O ensaio do micronúcleo em sangue periférico de ratinho

Conforme descrito no Enquadramento Teórico, o ensaio do micronúcleo pode ser utilizado *in vivo* para análise de efeitos cromossómicos em células hematopoiéticas de roedor, em conformidade com as linhas de orientação 474 da OECD (OECD, 1997). Seguindo esta orientação, e sem comprometer período de expressão prolongado para o ensaio de mutações, foram obtidas por punção da veia da cauda amostras de 5 µl de sangue periférico dos ratinhos, 42h após a segunda injeção de NM-102. Este foi imediatamente espalhado numa lâmina pré-revestida com laranja de acridina (1mg/ml; Sigma) e coberta com uma lamela. As lâminas foram conservadas em câmara húmida a 4°C, protegidas da luz, até à sua codificação e observação em microscopia de fluorescência com ampliação de 100x.

Foram avaliados 2000 eritrócitos imaturos (ou reticulócitos, RETs) registando-se entre estes os RETs com micronúcleos. Também foram contabilizados os eritrócitos maduros contendo micronúcleos.

Para aferir possíveis efeitos de mielotoxicidade, foram registados ainda os RET de tipo I, II ou III, sendo determinada para cada ratinho a proporção de eritrócitos imaturos (RETs) de entre os eritrócitos totais (maduros e imaturos).

6.4.3. O ensaio do cometa em órgãos de ratinho

As amostras de fígado e de baço dos ratinhos recolhidas no sacrifício foram utilizadas imediatamente para o ensaio do cometa *in vivo*. Foram colocados em 1 ml de solução tamponizada (D-PBS com 20 mM de EDTA e 10% DMSO; pH 7.0) e as células foram desagregadas mecanicamente. A suspensão foi colocada em gelo a repousar e retirou-se 5 - 10 µL para 75 µL de agarose de baixo ponto de fusão (1%), a 38°C. Com esta suspensão foram preparados 2 microgeis em lâmina revestida a agarose. O procedimento foi análogo ao descrito anteriormente para o ensaio do cometa *in vitro*, não tendo sido efetuado o tratamento enzimático opcional. Adicionalmente, foram usadas como controlo positivo do ensaio do cometa, lâminas de ratinhos não expostos que foram submersas por 15 minutos em peróxido de hidrogénio 10 mM antes da lise celular.

6.4.4. Ensaio de mutações no ratinho transgénico *LacZ*

O DNA genómico foi isolado a partir de amostras de fígado e de baço conforme descrito em Louro et al., 2002. Resumidamente, preparou-se um extracto celular em tampão (Tris 10 mM pH 8, NaCl 150 mM e EDTA 10 mM pH 8) utilizando um homogenizador de tecidos (IKA- Werke, Staufen, Alemanha). Adicionou-se 0.5 mg/ml Proteinase K, 1% de sódio dodecilsulfato (SDS) e 120 µg/ml de RNase A. A mistura foi incubada durante a noite a 56°C seguindo-se a purificação do DNA através de extracção com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (Moore, 1989). A última fase do isolamento de DNA de tecidos consistiu na precipitação com etanol absoluto (Merck) e sua lavagem em etanol 70%. Finalmente, o DNA foi seco ao ar durante aproximadamente 15 minutos e foi ressuspendido em tampão TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM pH 8) e armazenado a 4°C.

Para a recuperação (“rescue”) do plasmideo de entre o DNA genómico, recorre-se ao procedimento descrito na literatura (Louro et al., 2010), que se resume na Figura 34.

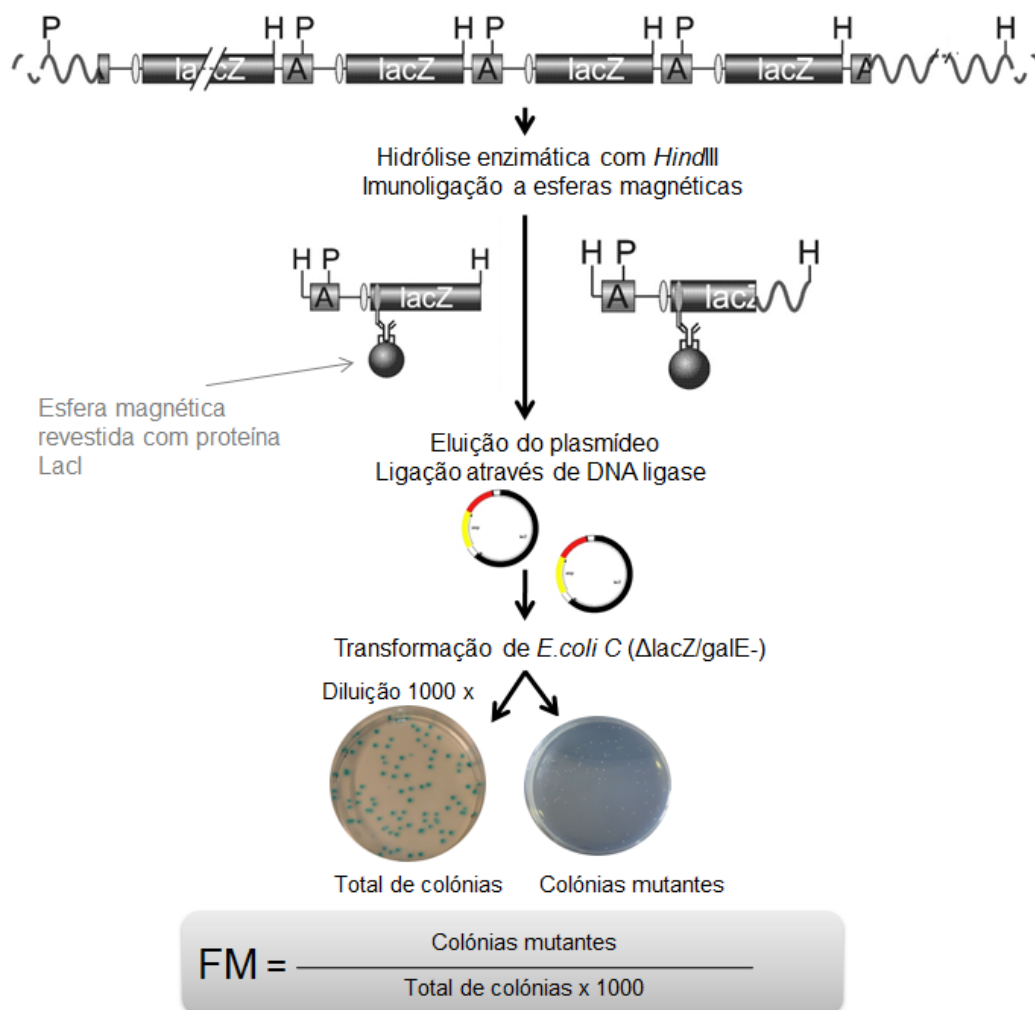


Figura 34. Processo de recuperação do transgene *LacZ* no modelo de ratinho baseado em plasmídeo (para descrição ver o texto; adaptado de Busuttill; Bahar; Vijg, 2007).

Os plasmídeos contendo o gene *LacZ* são recuperados de entre o DNA genómico através de hidrólise enzimática pela enzima *Hind*III e separação imunomagnética. Utilizaram-se esferas magnéticas Dynabeads (Invitrogen-Dynal), previamente revestidas com anticorpo β -galactosidase (Promega) e conjugadas com a proteína de fusão repressor *lacI*/ β -galactosidase (gentilmente cedida pelo RIVM, Holanda). Estas esferas possuem elevada afinidade para a sequência operadora do operão da lactose, permitindo separar os plasmídeos de entre o DNA genómico. Após a sua eluição das esferas magnéticas, a DNA ligase permite devolver a forma circular aos plasmídeos e estes são utilizados para transformar bactérias *E. coli* C $\Delta LacZ$ *galE*⁻ competentes, através de electroporação.

Uma parte das bactérias transformadas é incubada em placas de agar não selectivo (1:1000) e o restante em placas de meio selectivo de mutantes. A frequência

de mutantes (FM) é calculada como a razão entre estas, considerando o fator de diluição. Para cada órgão em estudo, a FM obtida após a exposição aos NMs foi comparada com a obtida nos ratinhos não expostos.

6.5. Bioacumulação dos nanomateriais *in vivo*

Nos ratinhos expostos aos NMs foram obtidas amostras de fígado excisadas 28 dias após a última injeção.

Para a análise histológica, os fragmentos de fígado fixados em formol (10% tamponado) foram embebidos em parafina após desidratação numa série progressiva de etanol e infiltração com xileno. Secções de 5 µm foram montadas em lâmina, desparafinadas, rehidratadas e coradas com Hematoxilina de Harris' e Eosina alcoólica (coloração H&E). As lâminas foram montadas com meio resinoso DPX. Foram preparadas pelo menos 2 lâminas por animal, com um mínimo de 10 secções em série. O seccionamento foi realizado com microtomo Jung RM2035 (Leica Microsystems, Darmstadt, Germany). Esta análise foi executada por Pedro Costa (Instituto do Mar, UNL e INSA).

Relativamente à análise por TEM, as amostras de fígado foram pré-fixadas em solução de glutaraldeído (2,5% glutaraldeído em 0,1 M cacodilato de sódio, pH 7,4). Posteriormente cada amostra foi seccionada em pequenos fragmentos de ~1 mm³ e fixadas numa mistura de paraformaldeído 2% e glutaraldeído 2,5% com 0.1 M cacodilato de sódio e 0,1 M sucrose (pH 7,4), durante 24h a 4°C. As amostras de tecido foram pós-fixadas em tampão 0.1 M cacodilato com 1% tetróxido de ósmio, durante a noite a 4°C; desidratadas num gradiente de etanol (30,50,70,95%, 20 min cada, e etanol absoluto 3x20 min) a 4°C e embebidas em resina Spurr (EMS, Washington, USA). As secções ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranilo e citrato de chumbo e foram examinadas num microscópio Morgagni 268D EM (FEI, The Netherlands). As imagens digitais foram adquiridas com um sistema CCD Mega-View (SIS, Münster, Germany), sendo este trabalho executado por Elsa Alverca (Departamento de Saúde Ambiental, INSA). No âmbito desta tese foram analisados apenas 4 animais, devido a problemas técnicos de difícil resolução.

6.6. Análise de dados e estatística

No decurso do estudo são apresentadas essencialmente duas abordagens estatísticas. Por um lado, os resultados experimentais são descritos através de estatística descritiva, com as respectivas médias e desvios padrões. A segunda abordagem é a inferência estatística, que foi utilizada com o objectivo de testar a hipótese da associação entre as variáveis resposta (frequência de micronúcleos, percentagem de DNA na cauda, frequência de mutações) e a exposição aos NMs ser uma ocorrência ao acaso (Ceppi; Gallo; Bonassi, 2011). Para a inferência utilizaram-se os testes estatísticos paramétricos e, sempre que não eram reunidos os pressupostos destes, utilizaram-se testes não paramétricos (Pestana; Gageiro, 1998), conforme se descreve de seguida.

Para os dados contínuos produzidos no ensaio de viabilidade celular, progressão do ciclo celular (CBPI e RI), ensaio do cometa e no ensaio de mutações, recorreu-se ao teste *t*-Student para comparar as médias resultantes da exposição a duas doses distintas, sendo este teste substituído pelo seu análogo não paramétrico, o teste de Mann-Whitney, nos casos em que não se verificou a distribuição normal dos dados e a homogeneidade de variâncias. Para a comparação simultânea entre as médias obtidas para as várias doses testadas procurou ainda utilizar-se a análise de variância a um factor, One-way ANOVA, seguida das comparações *post-hoc* (por exemplo de Bonferroni e H.S.D. de Tukey; Pestana; Gageiro, 1998). Por sua vez, no caso de não serem verificados os pressupostos para a ANOVA (i.e., normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias), foi utilizado o seu equivalente não paramétrico, o teste de Kruskal-Wallis.

Enquanto no ensaio do cometa foram analisadas 100 células por cultura celular/ ratinho (EFSA, 2012; Collins *et al.*, 2008), a frequência de mutantes no gene *LacZ* foi determinada para um mínimo de 100×10^3 colónias por animal ou 2.8×10^6 colónias por grupo de exposição (Boerrigter; Vijg, 1997; OECD, 2009; 2013). Para a comparação entre os animais de expostos às várias doses, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

O ensaio do micronúcleo gerou dados correspondentes a uma frequência de células micronucleadas, variável discreta, de um modo geral com uma ocorrência rara, inferior a 1% (Ceppi; Gallo; Bonassi, 2011). Assim, puderam ser estabelecidas tabelas de frequência 2x2, e aplicou-se o teste de Qui-Quadrado ou o teste exato de Fisher (quando as condições de aplicabilidade não eram reunidas) para as comparações, aos pares, dos valores obtidos em culturas expostas aos NMs e não expostas (Hashimoto

et al., 2011; Lindberg *et al.*, 2009). A mesma estratégia foi utilizada para os valores da frequência de eritrócitos imaturos micronucleados de ratinho, analisada através do teste Qui-quadrado com duas caudas.

Na pesquisa de um efeito dose-resposta (ou concentração-resposta) recorreu-se a análise de regressão para verificar qual o modelo matemático que melhor previa a resposta obtida em termos de citotoxicidade ou de genotoxicidade. Nesse sentido, o valor do coeficiente de determinação (R^2) gerado após a regressão indicou se a correlação dos dados com o modelo era elevada ou não e o valor obtido por ANOVA indicou se o modelo previa o resultado significativamente bem (caso $p < 0,05$). O valor de p do teste t -Student, associado aos coeficientes da equação obtida, indicou se estes contribuem de modo significativo para o modelo (no caso de $p < 0,05$). Por último, foram verificados os pressupostos da regressão, segundo os quais os resíduos devem distribuir-se aleatoriamente em torno de 0, tanto no modelo global como em relação a cada variável. Isto foi realizado através dos gráficos de diagnóstico quantil-quantil (q-q).

Para a análise da correlação entre as características físico-químicas de cada NM a que foram expostos os linfócitos com a respetiva frequência de células micronucleadas, recorreu-se ao coeficiente de correlação de Pearson. Para a aplicação deste teste, foi verificada graficamente a relação entre a frequência de células micronucleadas e a característica em causa. Esta análise é apresentada na secção de discussão.

Em toda a análise estatística, realizada utilizando o programa SPSS Statistics 20 (IBM), o nível de significância foi estabelecido como $\alpha=0.05$.

6.7. Questões éticas

O propósito deste projeto pode considerar-se eticamente legítimo considerando que visa, no seu todo, obter informação passível de conduzir a ações de prevenção de riscos para a saúde em indivíduos expostos, no ambiente ou local de trabalho, a agentes lesivos para o genoma. Uma vez que o estudo é realizado em modelos experimentais não-humanos, o risco que dele decorre para os indivíduos que dele virão a beneficiar pode ser considerado nulo. Assim, o interesse público que decorre do conhecimento gerado por este trabalho é elevado.

Globalmente, foram respeitados os princípios preconizados no Código de Conduta para Investigação responsável em nanociência e nanotecnologia (Tabela 28).

Tabela 28. Resumo dos princípios basilares do Código de Conduta para Investigação responsável em nanociência e nanotecnologia (Comissão Europeia, 2008).

PRINCIPIOS GERAIS	As actividades de investigação em NM...
Significado	...devem ser compreensíveis para o público e respeitar os direitos fundamentais, devendo ser conduzidos no interesse do bem-estar dos indivíduos e da sociedade no seu planeamento, implementação, disseminação e utilização.
Sustentabilidade	...devem ser seguras, éticas e contribuir para o desenvolvimento sustentável da comunidade e contribuir para os objectivos do Milénio das Nações Unidas. Não devem danificar ou ameaçar pessoas, animais, plantas ou o ambiente, no presente ou no futuro.
Precaução	...devem ser conduzidas de acordo com o princípio da precaução, antecipando potenciais impactos no ambiente, saúde e segurança, através de medidas preventivas proporcionais ao nível de proteção.
Inclusão	...devem ser guiadas por governança com princípios de abertura a todos os intervenientes, transparência e respeito pelo acesso legítimo à informação.
Inovação	... devem envolver governança que promova a máxima criatividade, flexibilidade e planeamento para a inovação e crescimento.
Responsabilidade	... os investigadores e organizações devem ser responsabilizáveis relativamente aos impactos sociais, ambientais e humanos que podem impor às gerações presentes e futuras.

Procurando responder a necessidades sociais prementes relativas à garantia da utilização segura dos NMs, o trabalho realizado foi divulgado nos meios científicos mas também foi disseminado em outros meios, através de conferências abertas ao público em geral e de publicação em revista com distribuição entre os gestores da área da saúde, procurando divulgar e esclarecer outros interlocutores do processo de regulação, ou mesmo os consumidores em geral.

Em termos metodológicos, a principal questão ética deste projeto relaciona-se com a experimentação animal. Foi respeitado o enquadramento ético vigente para a experimentação animal, que se baseia no conceito dos 3 Rs (OECD, 2009):

- *Replacement*: evitar ou substituir a experimentação animal, sempre que possível, por testes alternativos.
- *Reduction*: redução do número de animais utilizados, obtendo níveis comparáveis de informação de menor número de animais ou obtendo mais informação do mesmo número de animais
- *Refinement*: diminuição do sofrimento/desconforto causado aos animais ao mínimo, no caso em que o uso de animais é inevitável.

Efetivamente, a maioria das metodologias apresentadas neste projeto envolve ensaios em linhas celulares, só sendo analisado em ratinhos um único NM, com o objetivo de restringir o número de ensaios realizados em ratinhos. Por outro lado, procurando reduzir os animais utilizados, para obter o máximo de informação foram combinados vários ensaios de genotoxicidade *in vivo* no mesmo animal. Deste modo, o estudo foi concebido para respeitar estes três princípios.

Os animais foram mantidos, tratados com os NMs e manipulados no INSA, de acordo com as transposições nacionais das diretivas da UE (Comissão Europeia, 2010; 1986; Decreto-Lei n.º 129/92, Portaria n.º 1005/92). No período de desenvolvimento do estudo, as instalações dos ratinhos (biotério) no INSA encontram-se autorizadas pelo organismo responsável, a Direcção-Geral de Veterinária e a doutoranda possui habilitações de investigadora competente para experimentação animal (FELASA, nível C).

7. RESULTADOS

7.1. Caracterização da cito e genotoxicidade dos nanomateriais *in vitro*

7.1.1. Linfócitos humanos

Conforme descrito, recorreu-se a sangue de doadores saudáveis para estabelecer culturas primárias de linfócitos humanos, que foram expostas aos NMs em estudo, *in vitro* durante 30h e utilizadas na determinação da frequência de células micronucleadas.

A Figura 35 ilustra o aspeto dos linfócitos humanos com a citocinese bloqueada (células binucleadas) após exposição a NMs, nas lâminas para análise microscópica. Era visível a deposição de NMs de TiO_2 (Figura 34A) e NTCs na forma de grandes aglomerados (Figura 34B) sobre as lâminas, especialmente nas correspondentes a concentrações mais elevadas.

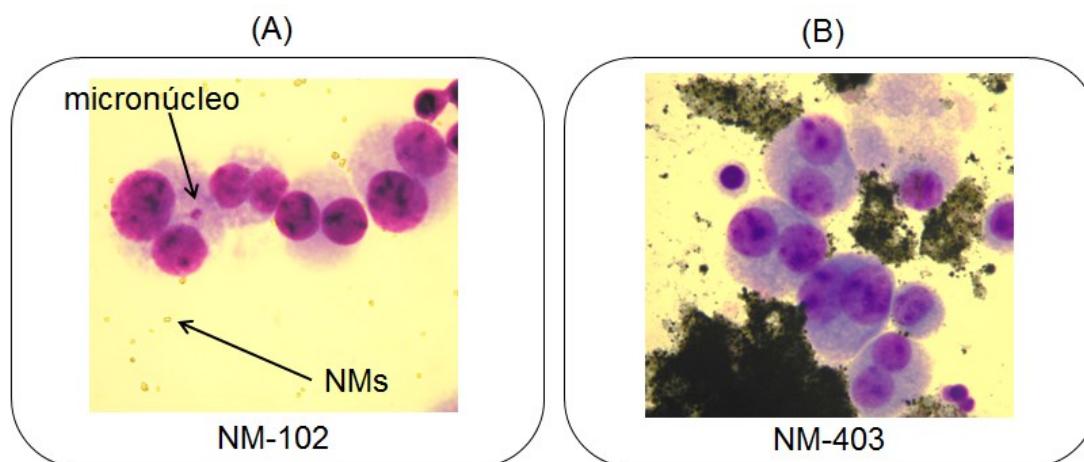


Figura 35. Exemplo de microfotografias ilustrativas do ensaio do micronúcleo em linfócitos humanos, expostos a (A) NM-102 ou (B) NM-403.

No caso do TiO_2 , os aglomerados de NM não atingiam dimensões muito relevantes e distinguíam-se dos micronúcleos pela sua refringência. No entanto, no caso dos NTCs, os aglomerados, que aumentavam com a concentração, atingiam grandes dimensões, chegando a cobrir mais de uma célula. Assim, a deposição dos NMs sobre as células causou alguma interferência com a análise de micronúcleo, não impedindo, contudo, a sua análise em áreas da lâmina menos cobertas de NMs.

Apenas no caso do NM-403, estes aglomerados impediram a análise do índice de proliferação (CBPI) nas doses mais altas (125 e 250 µg/ml).

Os resultados obtidos no ensaio do micronúcleo após exposição dos linfócitos humanos aos NMs apresentam-se nas Figuras 36 e 37, agrupados por classe de NM, sendo que as respectivas tabelas constam em Apêndice.

No caso dos NMs de dióxido de titânio (Fig.36A), a comparação estatística das médias de CBMN/1000 CB com as dos controlos negativos demonstrou um aumento significativo da frequência de células micronucleadas nas seguintes concentrações: 125 µg/ml de NM-102 ($p=0.038$), 5 e 45 µg/ml de NM-103 ($p=0.007$ e 0.039), 15 e 45 µg/ml de NM-104 ($p= 0.037$ and 0.048). Não se observou nenhuma diferença significativa no caso do NM-105. Apesar de algumas concentrações de alguns dos NMs de dióxido de titânio causarem um aumento da frequência de micronúcleos em linfócitos, nenhum deles produziu um efeito dose-resposta detetável por análise de regressão.

No que respeita ao impacto na viabilidade celular e progressão do ciclo celular, nem o CBPI nem o RI foram afectados significativamente pela exposição aos NMs de titânio (Fig. 36B e C).

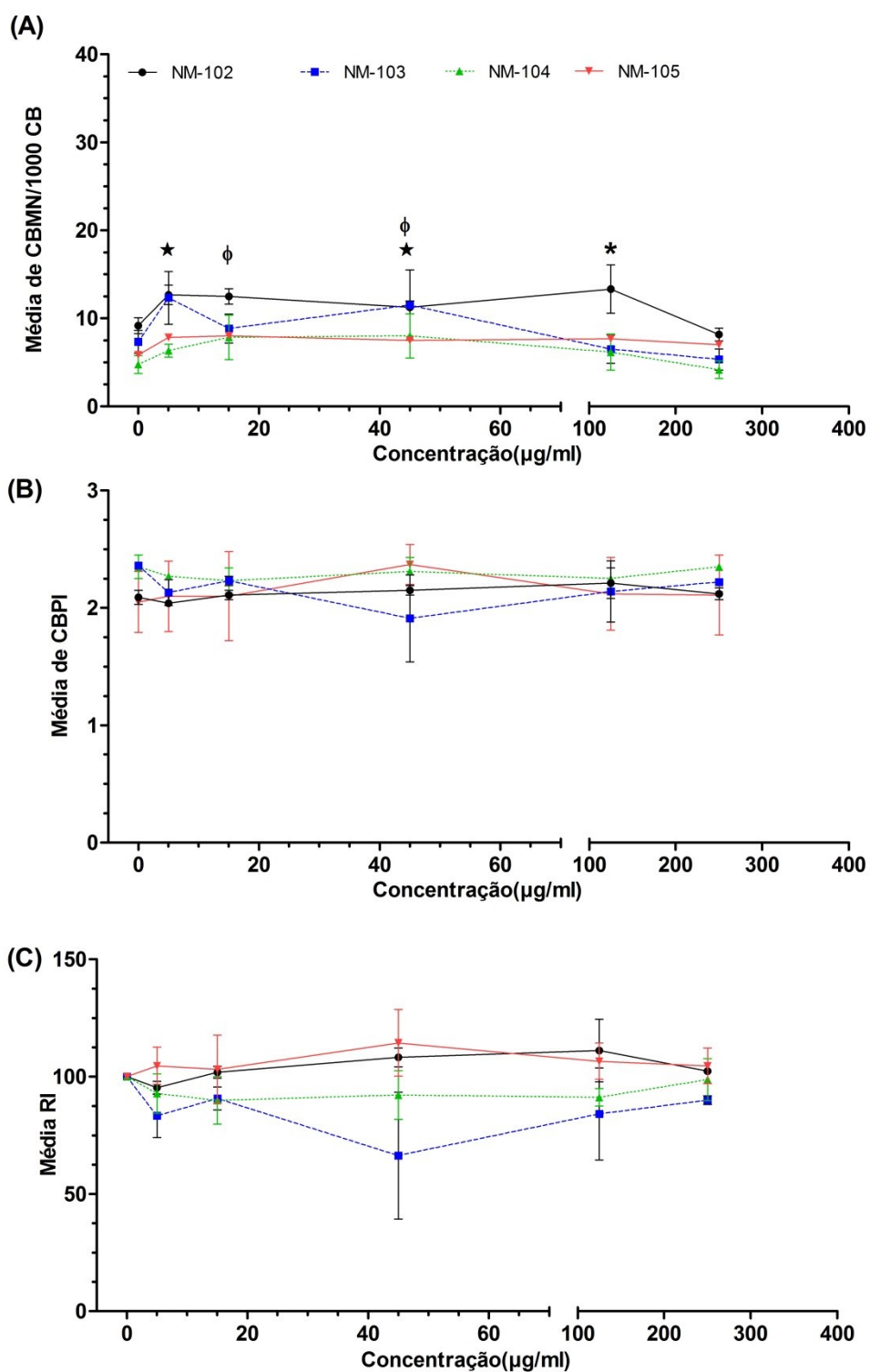


Figura 36. Resultados do ensaio do micronúcleo em linfócitos expostos a TiO_2 . Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão. (A) Frequência de micronúcleos em células binucleadas; (B) índice de proliferação com bloqueio da citocinese; (C) índice replicativo. Observaram-se diferenças significativas na frequência de CBMN em comparação com os controlos em: * NM-102, ★ NM-103 e Φ NM-104. O resultado da exposição à MMC em cada experiência apresenta-se nas tabelas A1.1 a A1.4. em apêndice ($p < 0,05$; teste exato de Fisher).

Relativamente aos nanotubos de carbono estudados (Fig. 37A), verificaram-se aumentos significativos da frequência de células micronucleadas nas seguintes concentrações: 15 µg/ml de NM-402 ($p = 0,015$), todas as concentrações de NM-403 ($p < 0.018$) excepto 125 µg/ml($p = 0,083$), 2,5 e 15 µg/ml de NRCWE-006 ($p = 0,007$ e 0,009). Para o NRCWE-007 e para os restantes NTCs não se observou nenhum aumento da frequência de células micronucleadas em linfócitos humanos (Figura 37A). Apesar dos resultados positivos para o NRCWE-006 e NM-403, não foi detetável um efeito dose-resposta para nenhum dos NMs. ~

O ciclo celular não foi significativamente afectado pela exposição aos NMs, conforme demonstrado pelos valores de CBPI e RI (Fig. 37B e C).

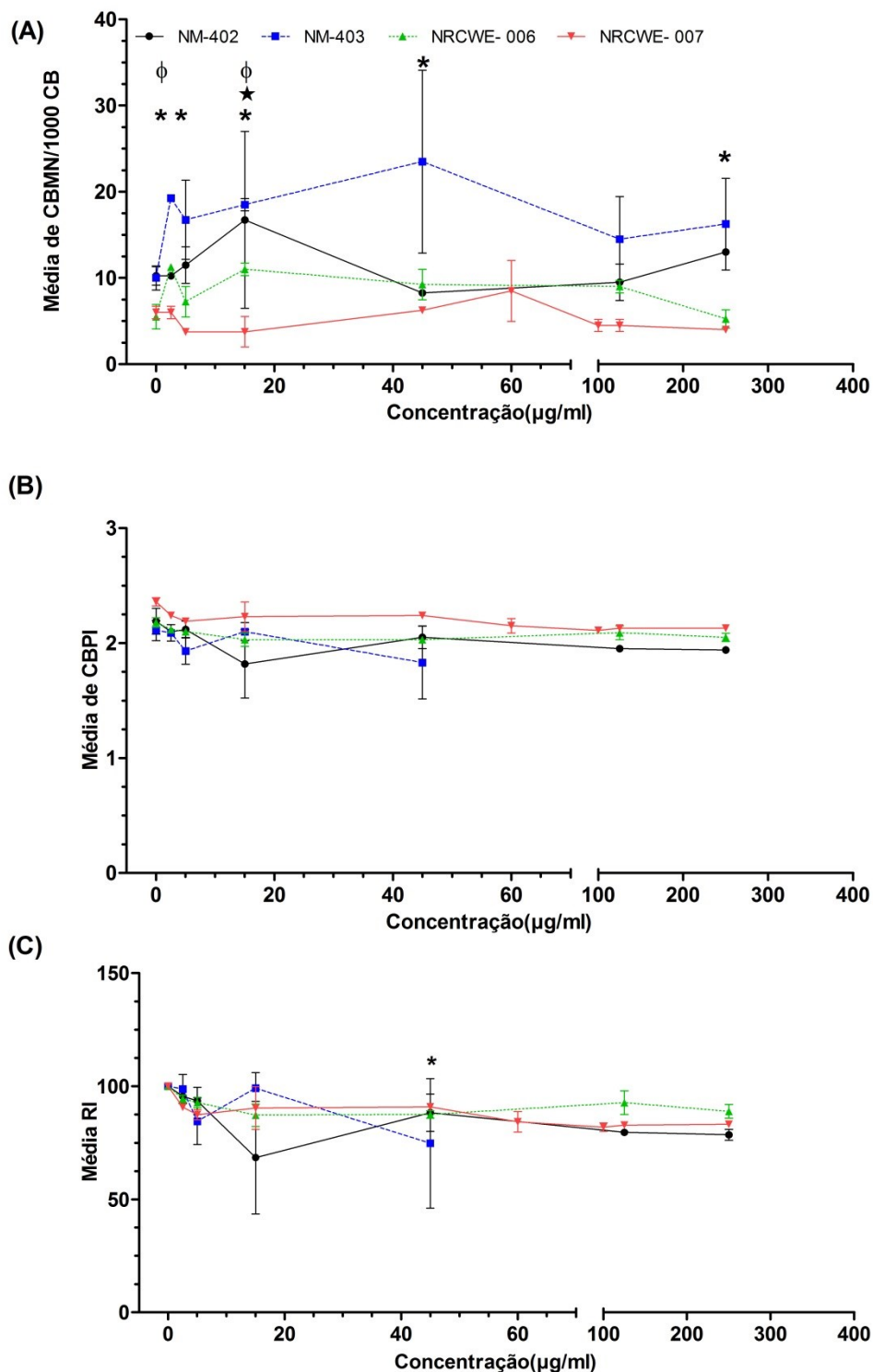


Figura 37. Resultados do ensaio do micronúcleo em linfócitos expostos a NTCs. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão. (A) Frequência de micronúcleos em células binucleadas; (B) índice de proliferação com bloqueio da citocinese; (C) índice replicativo. Observaram-se diferenças significativas na frequência de CBMN em comparação com os controles em: * NM-403, ★ NM-402 e Φ NRCWE-006. O resultado da exposição à MMC em cada experiência apresenta-se nas tabelas A1.1 a A1.4. em apêndice ($p < 0,05$; teste exato de Fisher).

Considerando o conjunto das experiências realizadas, o candidato a controlo positivo nanométrico, óxido de zinco (64 µg NM-110/ml) induziu um aumento significativo da frequência média de células binucleadas micronucleadas por 1000 células, que sofreram um aumento de $6,90 \pm 2,42$ para $11,41 \pm 4,15$ ($p = 0,0016$). Também causou um atraso na progressão do ciclo celular, verificada com a diminuição significativa no CBPI ($p = 0,046$). Analisando os resultados obtidos em cada experiência separadamente verificaram-se, regra geral, as mesmas tendências (Tabela A4.4. em apêndice).

Os resultados obtidos para o óxido de zinco em linfócitos humanos expostos a várias doses deste NM, no sentido de testar a sua utilização como um controlo nanométrico, são apresentados com detalhe em 7.1.4.

Por sua vez, considerando o conjunto das experiências realizadas, a exposição 0,167 µg/ml de mitomicina C (controlo positivo químico) resultou num aumento de 3,8 vezes na frequência média de células binucleadas micronucleadas por 1000 células, em comparação com o controlo ($p < 0,0001$) e numa diminuição significativa no CBPI ($p < 0,001$), tendências que também se confirmaram analisando os resultados obtidos em cada experiência separadamente (Tabelas A1.1 a A1.4. em apêndice).

Em relação à frequência de micronúcleos em células mononucleadas, cujos gráficos não são apresentados (Tabelas A1.2. em Apêndice), de entre todos os NMs estudados, apenas a exposição a 45 µg/ml de NM-103 resultou num aumento significativo da frequência de micronúcleos em células mononucleadas ($p = 0.013$).

7.1.2. Células BEAS-2B

Após o estudo da genotoxicidade de um conjunto de NMs em linfócitos humanos, foram selecionados alguns destes, representativos do seu grupo, para analisar em linhas celulares do trato respiratório, local privilegiado de entrada de muitos NMs no organismo. As células BEAS-2B, com origem no epitélio brônquico humano foram assim utilizadas para o ensaio do micronúcleo e para o ensaio do cometa *in vitro*. Em primeiro lugar foram realizados ensaios de citotoxicidade.

Verificou-se que a exposição das células BEAS-2B a um NM de cada classe causou, em alguns casos, a formação de aglomerados visíveis nas placas de cultura ou observáveis microscopicamente, logo após a exposição. Foi o caso do NM de

dióxido de titânio e do nanotubo de carbono (Fig. 38). Era visível um precipitado que aumentava com a concentração nas culturas celulares expostas a estes NMs. Com uma ampliação de apenas 20x, já se distinguiam alguns pequenos aglomerados de cor clara, de NM-102, sobrepostos na monocamada de células, e aglomerados de dimensões muito variáveis, de cor preta, no caso do NM-403.

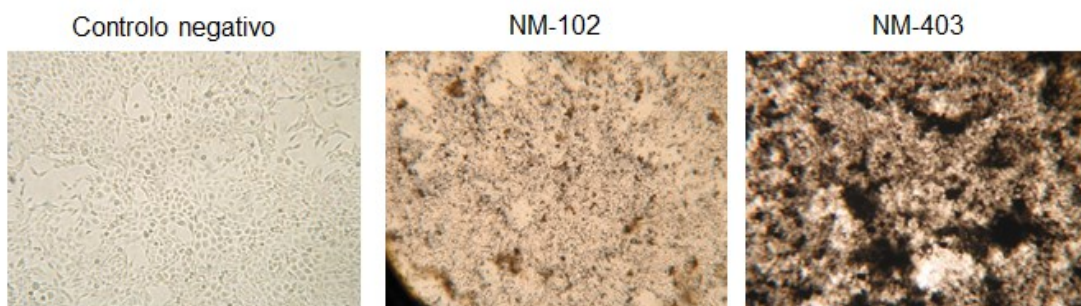


Figura 38. Microfotografias ilustrativas do aspeto das células BEAS-2B em cultura após exposição por 24 h ao controlo negativo ou a concentrações elevadas de NM-102 ou NM-403.

O efeito das doses mais elevadas foi particularmente visível na redução da viabilidade celular, 24h após a exposição a NM-102 determinada através da incorporação do azul de tripano (Figura 39).

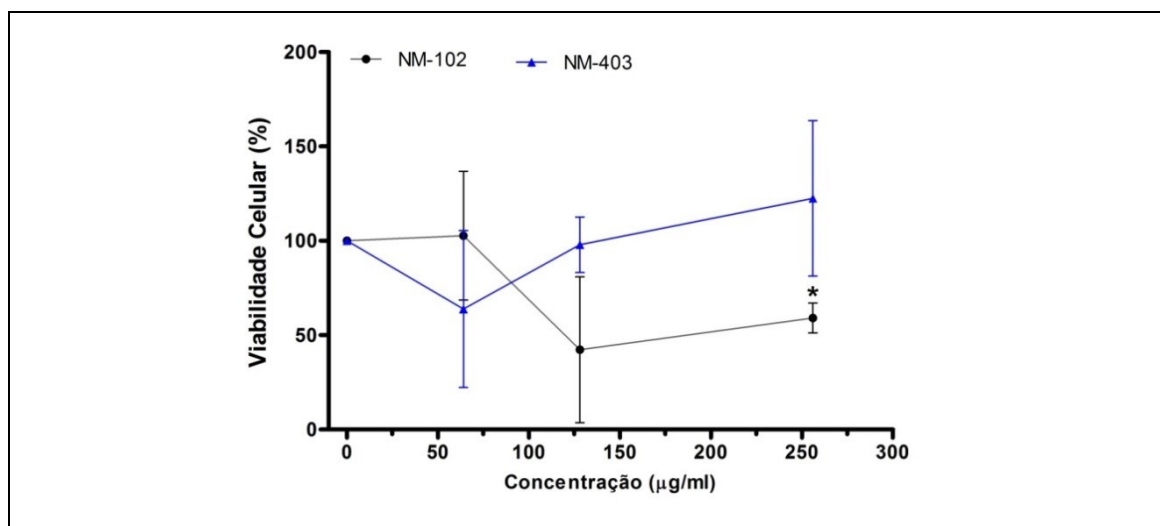


Figura 39. Viabilidade celular, determinada pelo ensaio do azul de tripano, após exposição das células BEAS-2B aos NMs. * Significativamente diferente do controlo negativo ($p=0,02$, teste t -Student). R

Verificou-se uma redução significativa da viabilidade (teste t -Student) após tratamento com 256 µg/ml de NM-102, não se tendo verificado, no entanto, alteração

da viabilidade celular devida ao NM-403. Não se observou efeito concentração-resposta para nenhum dos NM em estudo.

Apesar de as determinações efectuadas através deste método revelarem uma elevada variabilidade, o impacto da exposição aos NMs observado nas células BEAS-2B, bem como a falta de solubilidade observada nas culturas, justificou a selecção das doses para os ensaios de genotoxicidade, em linha com as orientações da OECD (OECD 2010) descritas na metodologia.

Após a exposição das células BEAS-2B, foi analisada a frequência de micronúcleos, a sua influência na progressão do ciclo celular e a indução de quebras na molécula de DNA através do ensaio do cometa.

Também nestas duas metodologias existiu alguma interferência nas determinações efectuadas, em consequência da acumulação de NMs sobre as células. Na Figura 39 são apresentadas algumas imagens ilustrativas deste aspeto.

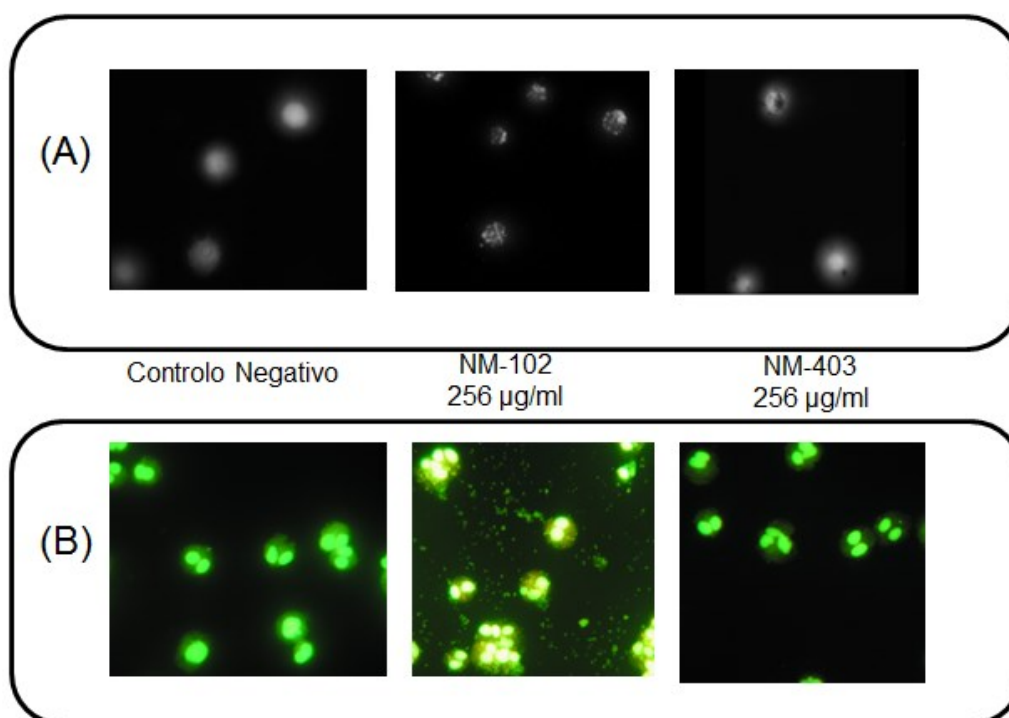


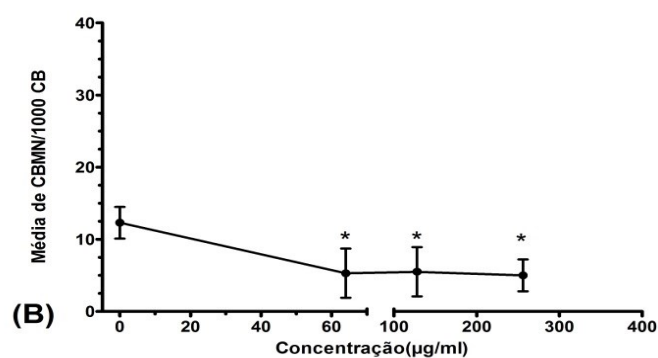
Figura 40. Microfotografias representativas dos ensaios de genotoxicidade nas células BEAS-2B expostas aos NMs. Resultados do (A) ensaio do cometa e do (B) ensaio do micronúcleo.

Os NMs de TiO_2 e de ZnO apresentavam-se na forma de agregados brancos de pequena dimensão sobre os nucleóides com elevada intensidade de fluorescência (ensaio do cometa, Figura 40A), enquanto os NTCs surgiam na forma de agregados escuros e de maiores dimensões sobre estes. No ensaio do micronúcleo (Figura 40B),

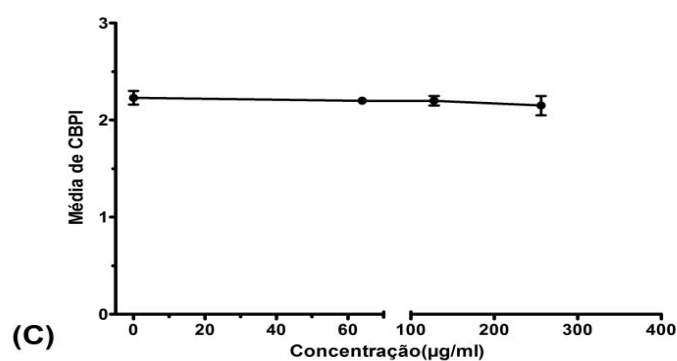
os NMs de TiO_2 , apresentavam-se como pequenos aglomerados refringentes, encontrando-se o citoplasma com um aspeto muito irregular. Após os NTCs, os aglomerados pretos obscureciam a análise em algumas áreas da lâmina e após a concentração mais elevada de ZnO , o número de células era escasso.

No entanto, quer para o ensaio do micronúcleo, quer do cometa, regra geral era possível efectuar as medições necessárias à obtenção de resultados. Apenas na dose mais elevada de ZnO (7,5 $\mu\text{g/ml}$) isto não foi possível devido à elevada toxicidade. Os resultados apresentam-se na Figura 41 e nas tabelas em apêndice.

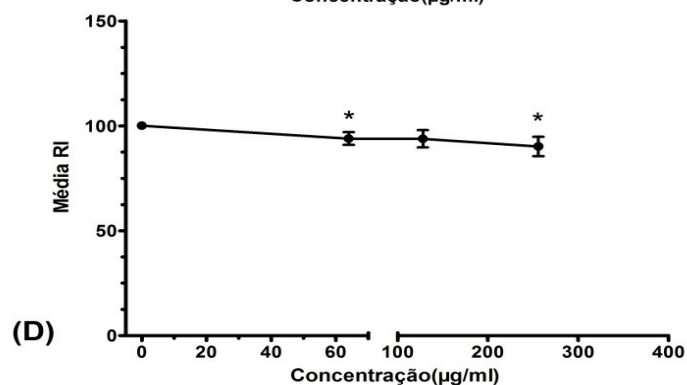
(A)



(B)



(C)



(D)

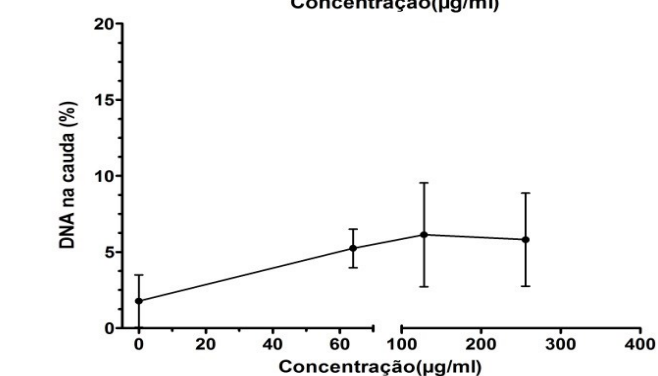


Figura 41. Resultados do ensaio do micronúcleo (A), CBPI (B), índice replicativo (C) e ensaio do cometa (D) em células BEAS-2B expostas a NM-102. * Significativamente diferente do controlo ($p < 0,05$; teste exato de Fisher ou teste de Kruskal-Wallis no caso do RI ou teste ANOVA a um factor no caso do cometa). O resultado da exposição à MMC ou EMS em cada experiência apresenta-se nas Tabela A2.2 em apêndice ($p < 0,05$; teste exato de Fisher ou Mann-Whitney).

Verificaram-se diferenças significativas na frequência de CBMN após todas as concentrações de NM-102 ($p= 0.001, 0.002, 0.001$, teste exacto de Fisher), que eram inferiores à do controlo negativo. Este decréscimo foi acompanhado de um atraso do ciclo celular, estando o índice replicativo significativamente alterado nas concentrações de 64 e 256 $\mu\text{g/ml}$ (0.028 e 0.023, teste ANOVA e post-hocs). Por outro lado, no que diz respeito aos resultados do ensaio do cometa, não se verificou nenhum aumento significativo na percentagem de DNA na cauda nem foi detectado efeito dose-resposta.

Relativamente à exposição aos NTCs (Figura 42), a concentração de 64 $\mu\text{g/ml}$ de NM-403 não induziu aumento na frequência de CBMN, mas pelo contrário reduziu-a significativamente ($p = 0.015$; teste de Fisher), não se verificando alteração na progressão do ciclo celular. Por sua vez, nenhuma das concentrações deste NM influenciou significativamente o nível de lesões detetadas através do ensaio do cometa.

Considerando os controlos positivos utilizados, MMC e EMS (resultados constam nas tabelas em Apêndice) verificou-se que aumentaram, respectivamente, a frequência de CBMN e a percentagem de DNA na cauda. A MMC também afetou significativamente a progressão do ciclo celular, medida através do CBPI e RI.

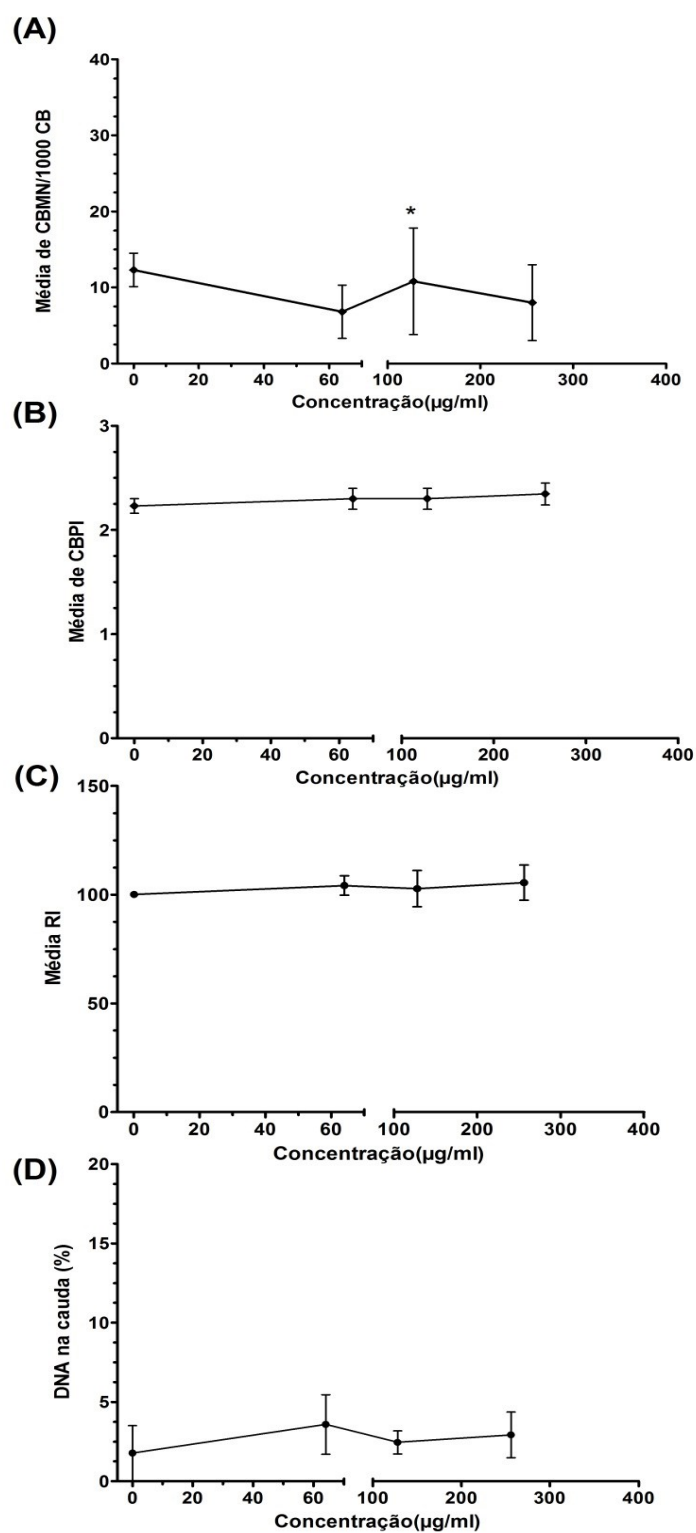


Figura 42. Resultados do ensaio do micronúcleo (A), CBPI (B), índice replicativo (C) e ensaio do cometa (D) em células BEAS-2B expostas a NM-403. * Significativamente diferente do controlo ($p < 0,05$; teste exato de Fisher ou teste de Kruskal-Wallis no caso do RI ou CBPI; teste ANOVA a um factor no caso do cometa). O resultado da exposição à MMC ou EMS em cada experiência apresenta-se nas Tabela A2.2 em apêndice ($p < 0,05$; teste exato de Fisher ou Mann-Whitney).

O NM-110 causou citotoxicidade nas células expostas à concentração mais elevada, i.e., 7,5 µg/ml ($p < 0.001$; ANOVA com post Hoc Tukey's HSD), não sendo possível determinar a frequência de CBMN nesta dose (Tabela A.2.2). Os resultados obtidos para este NM apresentam-se em detalhe na secção 7.1.4.

O ensaio do cometa foi repetido nesta linha celular para análise da contribuição das lesões oxidativas, e os resultados apresentam-se na secção 7.2.

7.1.3. Células A549

Como modelo complementar de células do trato respiratório, foram utilizadas células de adenocarcinoma epitelial de pulmão humano (A549) para os ensaios do micronúcleo e do cometa, bem como para a determinação da toxicidade, de NMs de TiO_2 e de MWCNTs.

Ensaio preliminares para a quantificação do potencial efeito citotóxico dos NMs nas células A549 através do ensaio da incorporação do vermelho neutro demonstraram interferência dos NMs com a leitura espectrofotométrica. Por esse motivo, recorreu-se ao ensaio clonogénico para esta determinação.

No ensaio com o NM-102 não se observava efeito visível sobre o número de colónias, como se demonstra na Figura 43, nem se encontrou correlação com uma função matemática.

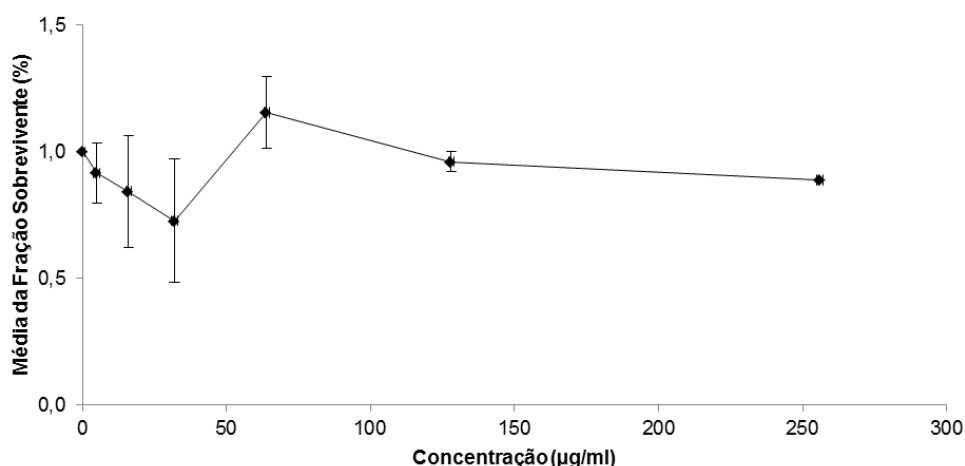


Figura 43. Resultados do ensaio clonogénico em células A549 expostas a NM-102 (Tabela A3.1. em apêndice).

Durante o ensaio clonogénico, verificou-se a citotoxicidade do NM-402 e 403 em células A549, observando-se um efeito dependente da concentração de NM e uma grande toxicidade devida à MMC e ao NM-110 (Figura 44).

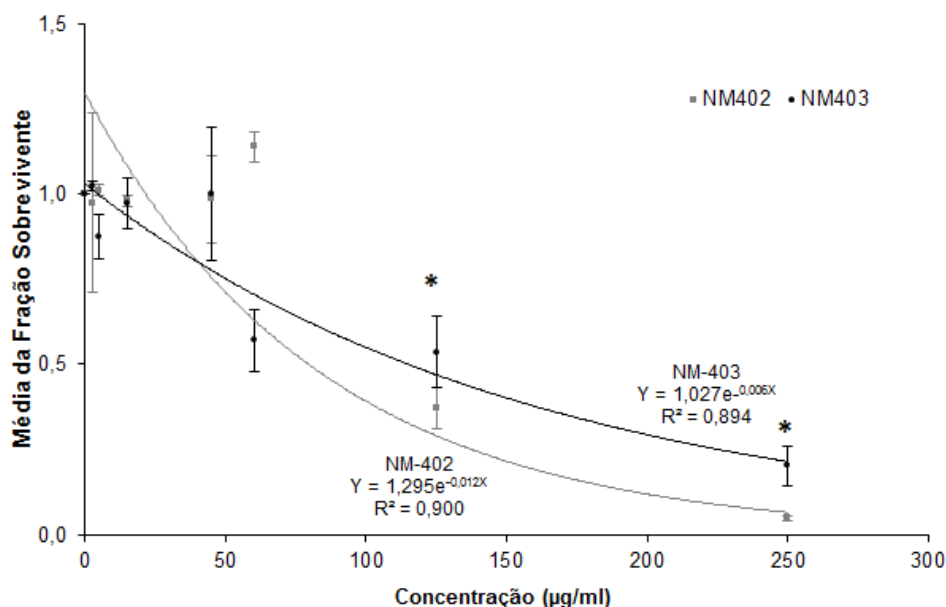


Figura 44. Resultados do ensaio clonogénico em células A549 expostas a NM-402 e NM-403. * Significativamente diferente do controlo ($p < 0,05$; teste t-Student). Resultados apresentados na Tabela A3.1. em apêndice.

No caso dos NTCs, verificou-se uma relação dose-resposta com elevada correlação a um modelo exponencial ($R^2 = 0,900$ para o NM-402 e $0,894$ para o NM-403), que prevê a variável resposta significativamente bem ($p < 0,0001$, ANOVA) e cujo declive é significativo ($p < 0,00001$, teste t-Student). O modelo exponencial foi validado estatisticamente através da análise dos resíduos e este modelo demonstrou através desta análise ser mais adequado que o quadrático para descrever os dados.

Através das equações obtidas com a aplicação do modelo exponencial, foi determinada a dose com um efeito de 50%, EC_{50} :

Tabela 29. Relação dose-resposta observada relativamente à sobrevivência celular após NTCs.

	Equação do modelo	EC_{50} (µg/ml)
NM-402	$Y = 1,295e^{-0,012X}$	79,30
NM-403	$Y = 1,027e^{-0,006X}$	120,13

Foi realizado o ensaio do micronúcleo nas células A549 expostas a NM-102, NM-402 e NM-403. Após a exposição a NM-102, os NMs eram visíveis sobre as células.

Os resultados obtidos para o ensaio do micronúcleo e para o ensaio do cometa em células A549 expostas a NM-102 apresentam-se na Figura 45.

Não foram detectadas diferenças significativas na frequência de micronúcleos em relação ao controlo (teste exato de Fisher), embora o controlo positivo (MMC) tenha causado um aumento significativo de cerca de 9 vezes na frequência de micronúcleos ($p < 0,0001$, teste de Fisher).

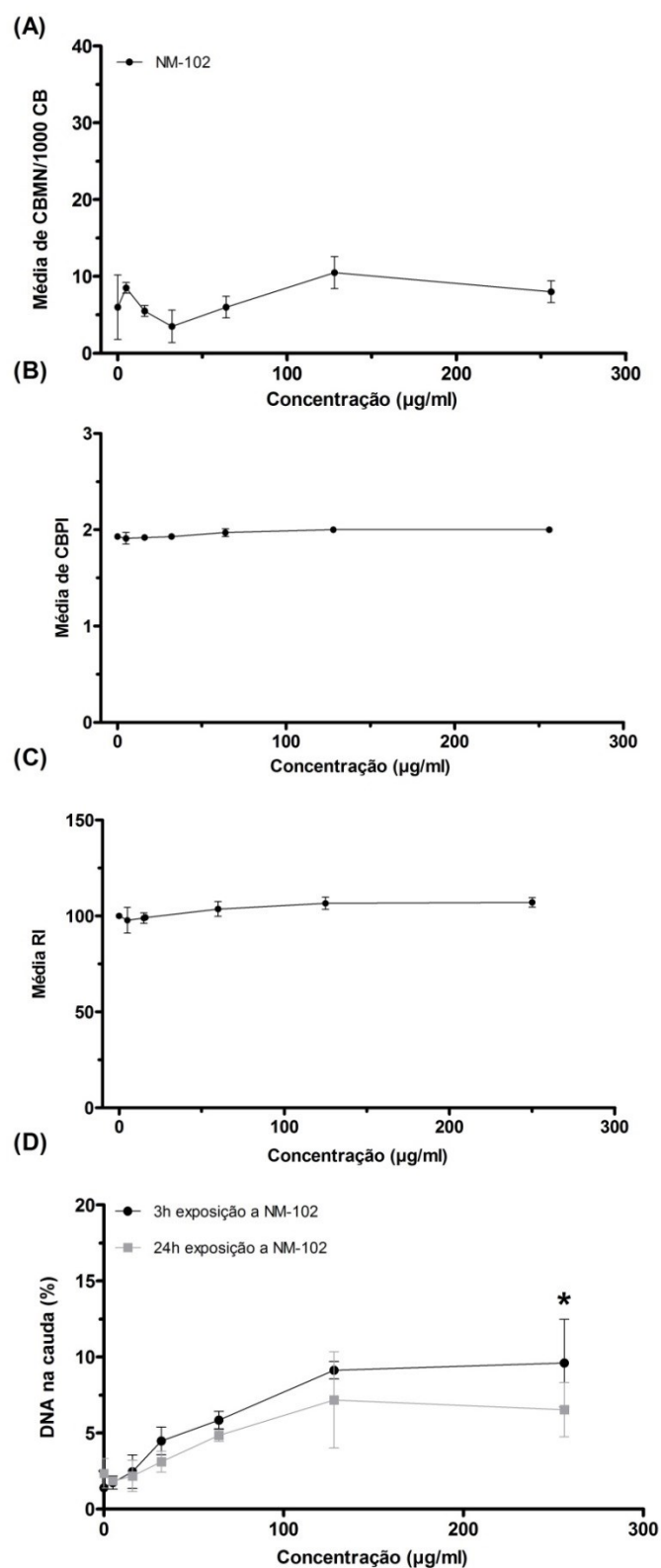


Figura 45. Resultados do ensaio do micronúcleo e do cometa em células A549 expostas a NM-102. * Significativamente diferente do controle ($p < 0,005$, teste de Mann-Whitney). O resultado da exposição à MMC ou a peróxido de hidrogénio em cada experiência apresenta-se nas tabelas A3.2 a A3.3. em apêndice ($p < 0,05$; teste exato de Fisher ou Mann-whitney).

No ensaio do cometa observou-se um ligeiro aumento do nível de quebras de DNA, que era dependente da dose, após 3h de exposição. Assim, a curva obtida seguia uma função quadrática de equação:

$$Y = -0,00022X^2 + 0,0896X + 1,461$$

com $R^2 = 0,913$ ($p < 0,05$, teste ANOVA e teste t -Student do declive). O modelo quadrático foi validado através da análise de resíduos, considerando exposição de 3h.

Após 24h de tratamento não havia efeitos estatisticamente significativos, embora a tendência para um aumento de quebras com a concentração fosse visível (Figura 45D).

Porém, a relação dose-resposta observada após 3h de exposição não deve ser muito valorizada uma vez que se observou que as células expostas a maiores concentrações de NM-102 não têm cauda maior como seria de esperar, mas antes apresentam mais agregados sobre os nucleoides, que interferem com a medição, como se exemplifica na Figura 46:

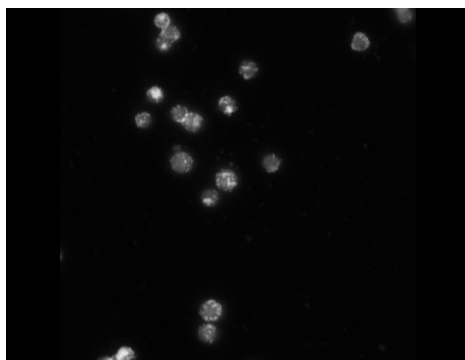


Figura 46. Microfotografia das células A549 expostas à dose mais elevada de NM-102, ilustrando a ausência de cometas mas a elevada intensidade da fluorescência do nucleóide devida à aglomeração de NMs (10x ampliação).

No ensaio do micronúcleo nas células A549, também era visível a deposição de NTCs sobre as lâminas, especialmente nas doses mais elevadas.

As concentrações mais elevadas de NM-402 (125 e 256 $\mu\text{g/ml}$) induziram um aumento de cerca de duas vezes na frequência de CBMN comparativamente aos controlos ($p = 0,006$ e $0,019$, respectivamente). Relativamente ao ensaio do cometa, observou-se um ligeiro aumento, sem significado estatístico, no nível de quebras no DNA após 3h de exposição a NM-402, não se tendo observado nenhuma diferença relevante após 24h ou relativamente à exposição a NM-403.

Os resultados do ensaio do micronúcleo e o do ensaio do cometa em células A549 expostas a NMs apresentam-se na Figura 47.

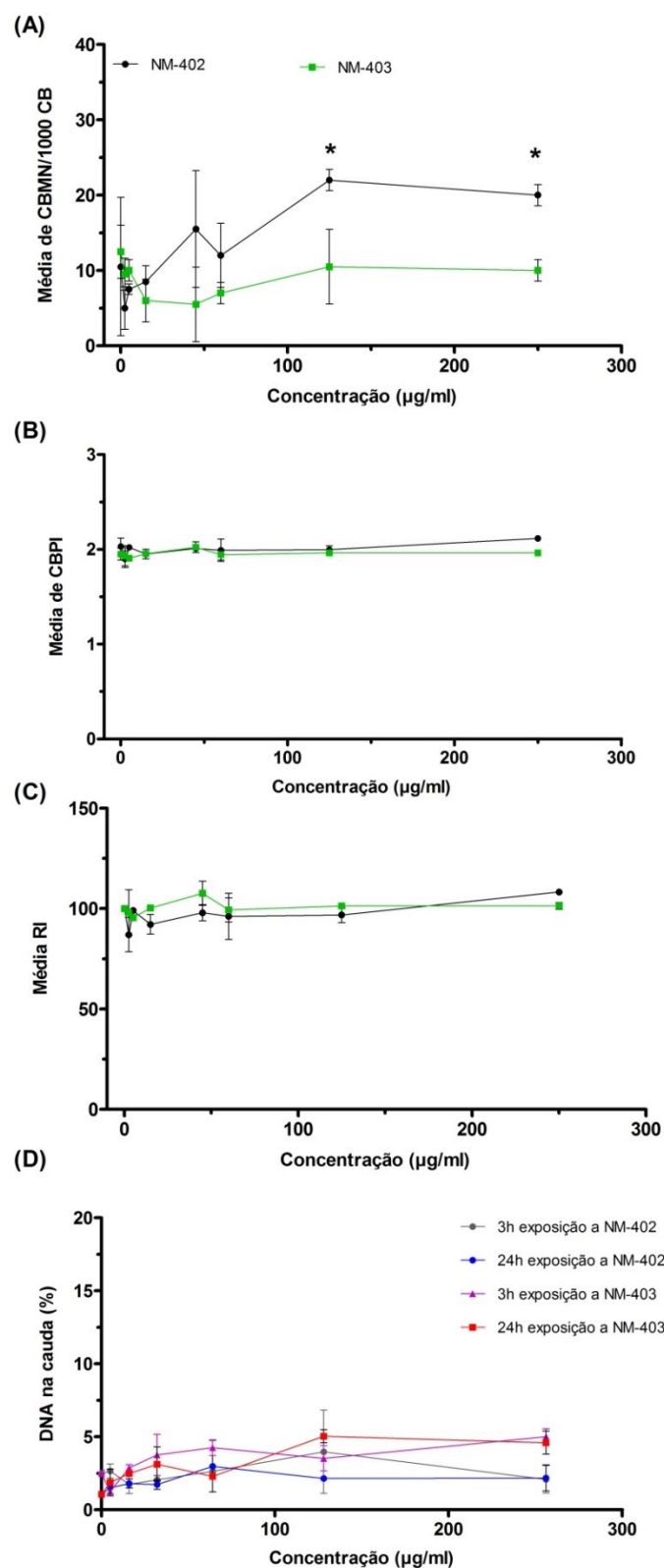


Figura 47. Resultados do ensaio do micronúcleo (A), CBPI (B), RI (C) em ensaio do cometa (D) em células A549 expostas a NTCs. *Significativamente diferentes do controlo ($p < 0,05$, teste de Fisher), para o NM-402. O resultado da exposição à MMC ou a peróxido de hidrogénio em cada experiência apresenta-se nas tabelas A3.2 a A3.3. em apêndice ($p < 0,05$; teste exato de Fisher ou Mann-whitney).

No caso da frequência de micronúcleos após exposição a NM-402, a análise de regressão indicou uma relação dose-resposta ajustada a um modelo quadrático ($R^2=0.861$; $p=0,007$ no teste ANOVA, $p=0,011$, teste t -Student). A equação obtida, descrevendo um modelo quadrático, foi validada através da análise de resíduos e correspondeu a:

$$Y = -0,0004X^2 + 0,1638X + 6,9895$$

Utilizando esta função matemática foi possível a determinação da EC_{50} como sendo 26,15 $\mu\text{g/ml}$, para o NM-402.

No caso do NM-403 não se verificou dose-resposta em relação ao ensaio do micronúcleo.

Por sua vez, nem o índice CBPI nem o RI foram alterados pelo tratamento com NM-102, NM-402 ou NM-403, conforme representado na Figura 46.

Os controlos positivos, MMC e ZnO, aumentaram significativamente a frequência de CBMN ($p < 0,05$, teste exacto de Fisher), não tendo a MMC reduzido o CBPI (Tabelas em Apêndice). Os resultados para o ZnO são apresentados na secção seguinte.

O ensaio do cometa não apresentou aumentos significativos nas quebras de DNA após exposição por 3h ou 24h aos dois NTCs.

7.1.4. Efeitos do óxido de zinco em células humanas

Como já foi referido, o NM de óxido de zinco foi utilizado no âmbito deste projeto com o objetivo de verificar se era um NM adequado para implementar como uma referência de dimensões nanométricas nos testes de genotoxicidade. A gama de concentrações selecionada para a exposição relaciona-se com a toxicidade verificada em estudos preliminares em cada linha celular. Assim, a gama de doses selecionadas para os linfócitos fundamentou-se na interferência da concentração do NM-110 com a progressão do ciclo celular. Nas células BEAS-2B, a selecção baseou-se no ensaio do azul de tripano (Figura 48; tabelas em apêndice).

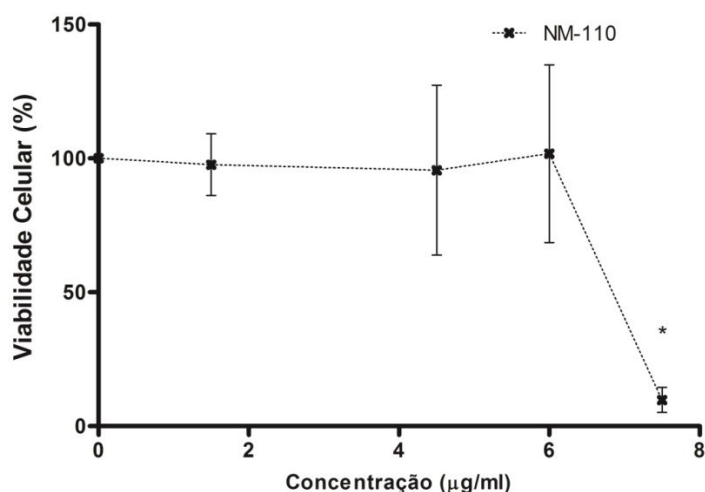


Figura 48. Resultado do ensaio de viabilidade celular do azul de tripano, após exposição das células BEAS-2B por 24h a ZnO. * Significativamente diferente do controlo negativo ($p < 0,05$, teste t -Student). Tabela A4.1. em apêndice.

Verificou-se uma redução significativa da viabilidade celular após exposição a 7,5 µg/ml de NM-110, motivo pelo qual nos ensaios subseqüentes se utilizaram concentrações abaixo deste valor nas células BEAS-2B.

A determinação da viabilidade celular nas células A549 foi realizada através do ensaio da incorporação do vermelho neutro (Figura 49).

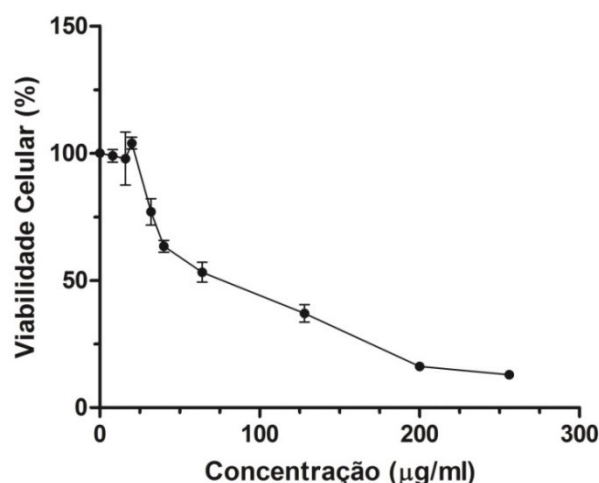


Figura 49. Resultado do ensaio de viabilidade celular do vermelho neutro em células A549 expostas a NM-110, apresentados na Tabela A4.2. em apêndice.

A relação dose-resposta em células A549 indicou uma elevada correlação ($R^2 = 0,979$) com um modelo exponencial, de equação:

$$Y = 103,38e^{-0,009X}$$

Esta equação prevê a variável resposta significativamente bem ($p = 5,2 \times 10^{-16}$, Anova) e com um declive significativo ($p < 0,00001$, teste t-Student), para além de que foi validada através da análise de resíduos. Utilizando este modelo determinou-se a concentração EC_{50} como sendo 80,73 µg/ml de NM-110. Para os ensaios subsequentes em A549 utilizou-se uma concentração inferior a esta.

O ensaio clonogénico foi também realizado, para a concentração de 20 µg/ml, confirmando a citotoxicidade do NM-110 em baixas doses.

Os resultados do ensaio do micronúcleo, obtidos nas várias linhas celulares analisadas apresentam-se na Figura 50, onde é visível também a interferência do óxido de zinco, nas concentrações mais elevadas, com a progressão do ciclo celular.

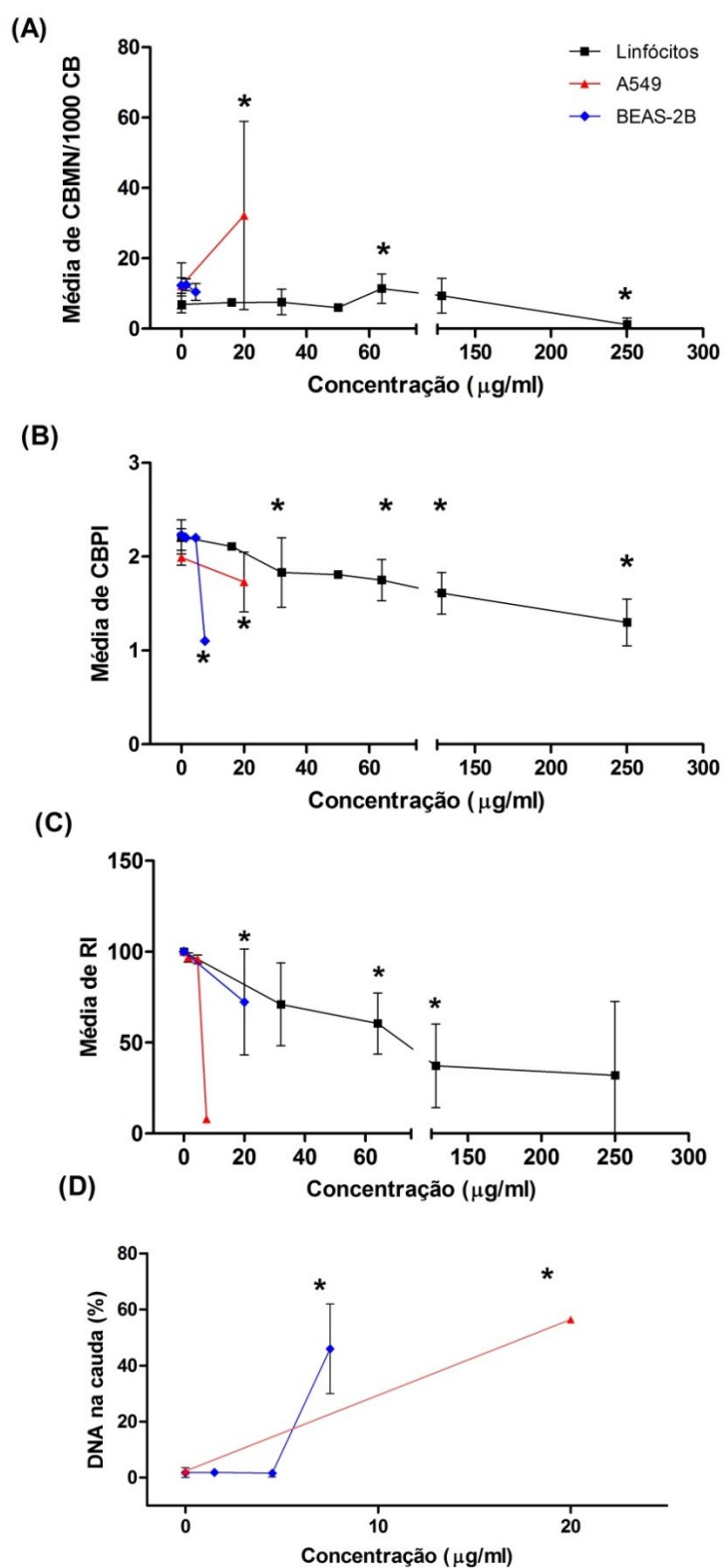


Figura 50. Resultados do ensaio de micronúcleo e do cometa após exposição de linfócitos humanos, células BEAS-2B e A549 a NM-110. * Significativamente diferente do controlo ($p < 0,05$; teste exato de Fisher, teste de Kruskal-Wallis no caso do CBPI e RI ou teste ANOVA no caso do cometa). O resultado da exposição à MMC apresenta-se na Tabelas A4.1 em apêndice ($p < 0,05$; teste exato de Fisher).

Nos linfócitos, o NM-110 induziu diferenças significativas na frequência de CBMN na concentração de 64 µg/ml (Figura 49A; $p < 0,05$, teste exacto de Fisher), que estava aumentada relativamente aos controlos negativos, embora tenha causado uma diminuição significativa na concentração de 250 µg/ml. Também causou um acentuado decréscimo no CBPI a partir da concentração de 32 µg/ml ($p < 0,05$; Teste t -Student). Não se verificou relação dose-resposta nem nas CBMN nem no CBPI.

O NM-110 causou também citotoxicidade nas células BEAS-2B expostas à concentração mais elevada, 7.5 µg/ml ($p < 0,001$; ANOVA com post Hoc Tukey's HSD), não sendo possível determinar a frequência de CBMN nesta dose (Figura 50B.). Em concentrações inferiores não se observou alteração da frequência de CBMN ou no CBPI.

Nas células A549 expostas a 20 µg/ml de NM-110, verificou-se um aumento significativo da frequência de CBMN ($p < 0,0001$, teste exacto de Fisher) em simultâneo com uma diminuição do CBPI (Figura 50A).

No ensaio do cometa, a dose de 7,5 µg/ml de NM-110 causou um aumento significativo de percentagem de DNA na cauda nas células BEAS-2B ($p < 0,001$; ANOVA com post Hoc Tukey HSD) sendo que nas A549 também se verificou um aumento significativo na concentração de 20 µg/ml ($p < 0,05$; teste de Mann-Whitney). O aparente aumento na percentagem de DNA na cauda nas células BEAS-2B será provavelmente devido à interferência da citotoxicidade verificada nesta dose (Figura 50B).

7.1.5. Análise comparativa dos efeitos do dióxido de titânio em células humanas

Na tentativa de correlacionar os efeitos genotóxicos do dióxido de titânio observados em cada uma das linhas celulares utilizada, os resultados do ensaio do micronúcleo e do ensaio do cometa foram comparados, como se ilustra na Figura 51:

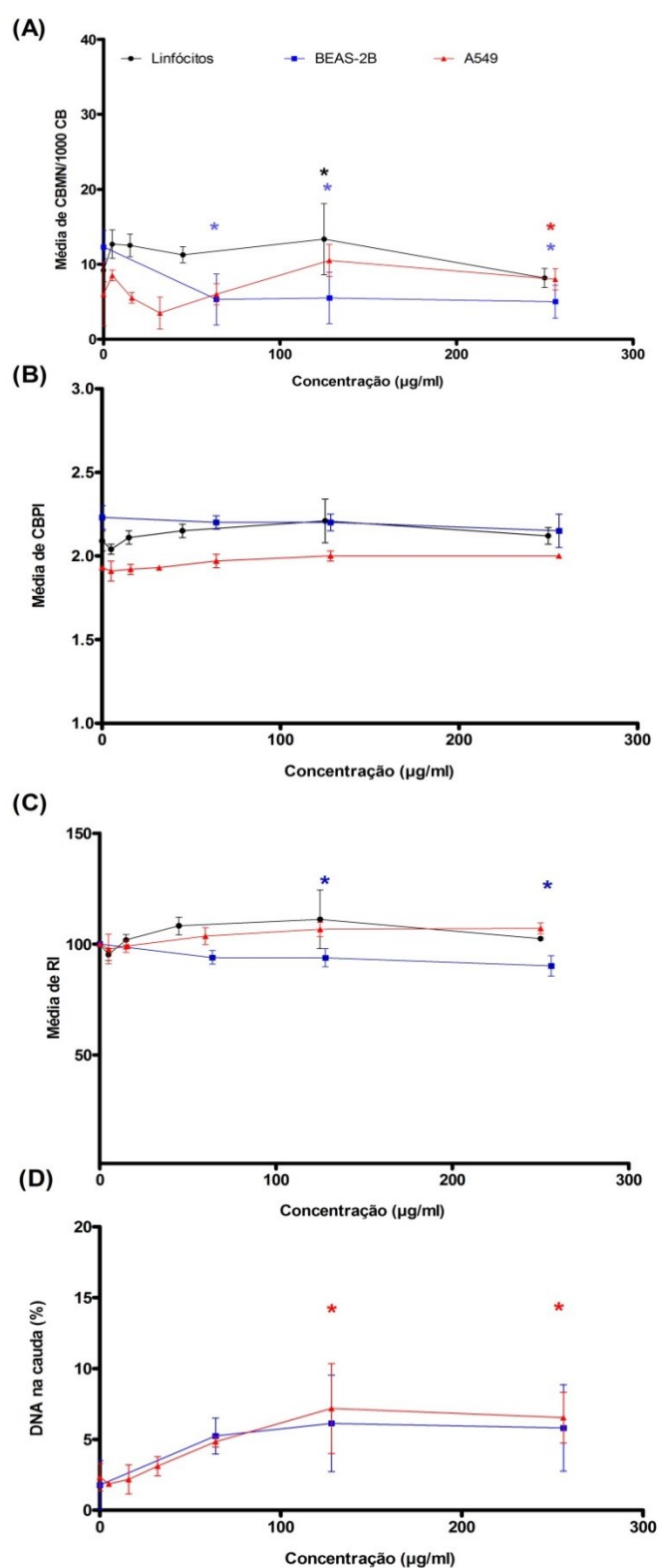


Figura 51. Comparação da média da frequência de CBMN, CBPI, RI e DNA na cauda obtida em cada tipo celular exposto a NM-102. * Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$; teste exato de Fisher ou teste de Kruskal-Wallis no caso do CBPI e RI ou teste ANOVA a um factor no caso do cometa). Os resultados constam nas Tabelas em apêndice.

Em relação à frequência de micronúcleos, verifica-se que o efeito observado nas células BEAS-2B é distinto do efeito verificado nos linfócitos humanos expostos a NM-102. Nestes últimos, ocorre um ligeiro aumento de CBMN logo nas concentrações mais baixas, que é significativo na concentração de 125 µg/ml. No entanto, nas células BEAS-2B ocorre uma diminuição da frequência de CBMN. Por sua vez, nas células A549 não há alterações significativas.

No entanto, relativamente à progressão do ciclo celular (quantificada pelo CBPI) ou às quebras de DNA (ensaio do cometa), o resultado observado nas várias linhas celulares é mais semelhante.

O ensaio do cometa em células BEAS-2B e em células A549, expostas por 24h, apresenta resultados muito semelhantes, com um ligeiro aumento dependente da concentração. Como foi anteriormente referido, este aumento quebras no DNA deve ser interpretado cautelosamente, devido à interferência dos NMs com a quantificação das lesões e deverá ser mais investigado.

7.1.6. Análise comparativa dos efeitos dos nanotubos de carbono em células humanas

Para correlacionar os efeitos genotóxicos dos NTCs observados em cada uma das linhas celulares utilizada, os resultados foram comparados na Figura 52:

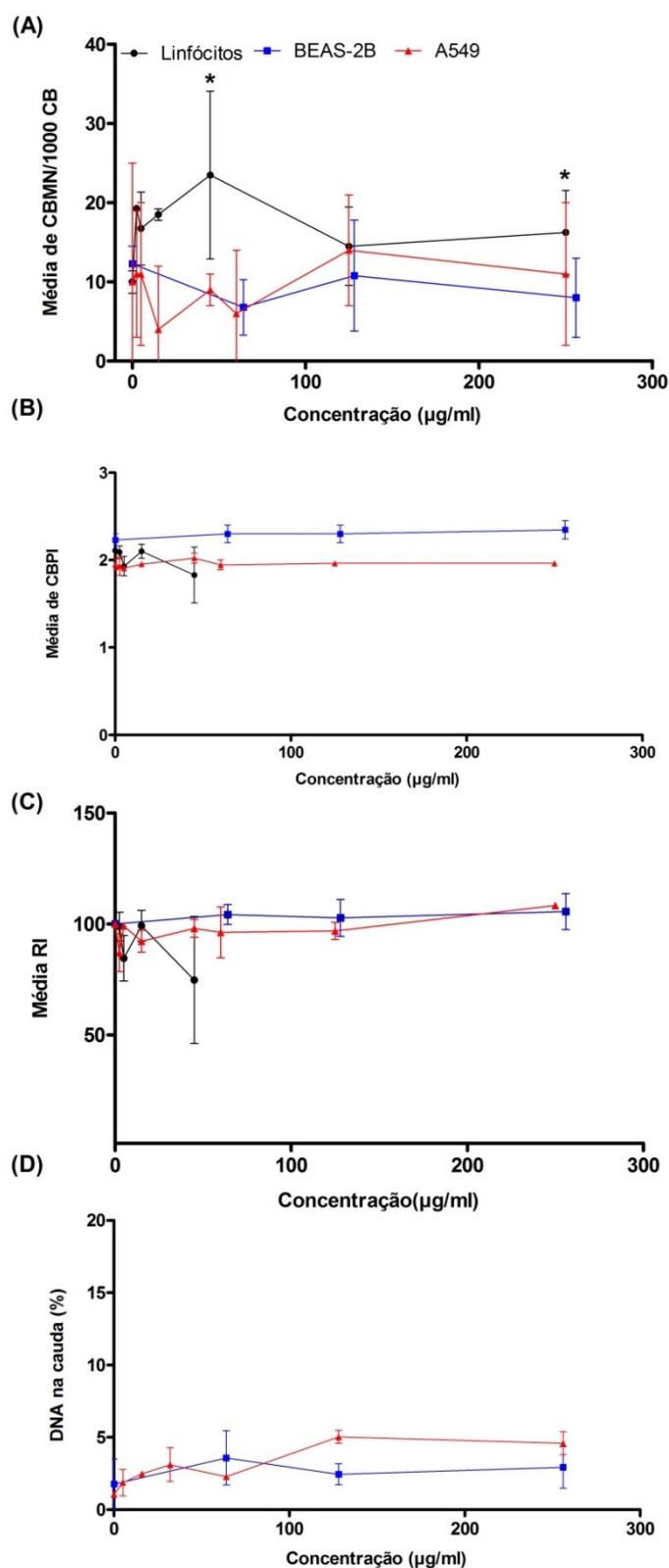


Figura 52. Comparação da frequência média de CBMN, CBPI, RI ou DNA na cauda obtida em cada tipo celular exposto a NM-403. *Significativamente diferente dos controles ($p < 0,05$; teste exato de Fisher, teste de Kruskal-Wallis no caso do CBPI e RI ou teste ANOVA no caso do cometa). Os resultados constam nas Tabelas em apêndice.

Verifica-se que o efeito clastogénico observado nas células A549 e BEAS-2B é muito semelhante, mas distingue-se claramente do efeito verificado nos linfócitos humanos. Nestes últimos, ocorre um aumento de CBMN logo nas concentrações mais baixas, que é significativo em todas as doses, excepto na de 125 µg/ml. Por sua vez, nas outras linhas celulares o efeito genotóxico deste NM em algumas concentrações é mesmo menor que o do controlo negativo. Relativamente ao CBPI e quebras no DNA não se verificam grandes variações entre as respostas das duas linhas celulares.

7.2. Determinação de lesões oxidativas induzidas pelos NMs *in vitro*

Como foi descrito na Metodologia, o ensaio do cometa modificado pela incorporação de uma digestão com a enzima bacteriana FPG (Collins *et al.* 2008) fornece uma medida das pirimidinas oxidadas/ purinas alteradas, permitindo detectar lesões oxidativas no DNA que contribuam para eventuais efeitos genotóxicos dos NMs. Nesta secção apresentam-se os resultados do ensaio do cometa modificado pela utilização de enzima FPG em células BEAS-2B e A549 expostas aos NMs (Figuras 53 e 54).

Utilizando o ensaio do cometa modificado, nas células BEAS-2B expostas por 24h aos NMs NM-102, NM-403 e NM-110 não se observou aumento de quebras no DNA comparativamente ao controlo, embora se tenha verificado um aumento significativo nas células expostas ao controlo positivo ($p = 0,01$, teste de Mann-Whitney). Embora anteriormente, no ensaio de cometa convencional se tivesse verificado um ligeiro aumento de lesões de DNA após exposição às concentrações de 64 e 256 µg/ml de NM-102, este efeito deixou de se verificar no ensaio do cometa modificado, em que foi utilizada uma concentração de agarose de baixo ponto de fusão mais concentrada (1%). Comparando os resultados do ensaio do cometa com e sem utilização de FPG, obtém-se a contribuição das lesões oxidativas, também ilustrada na Figura 53.

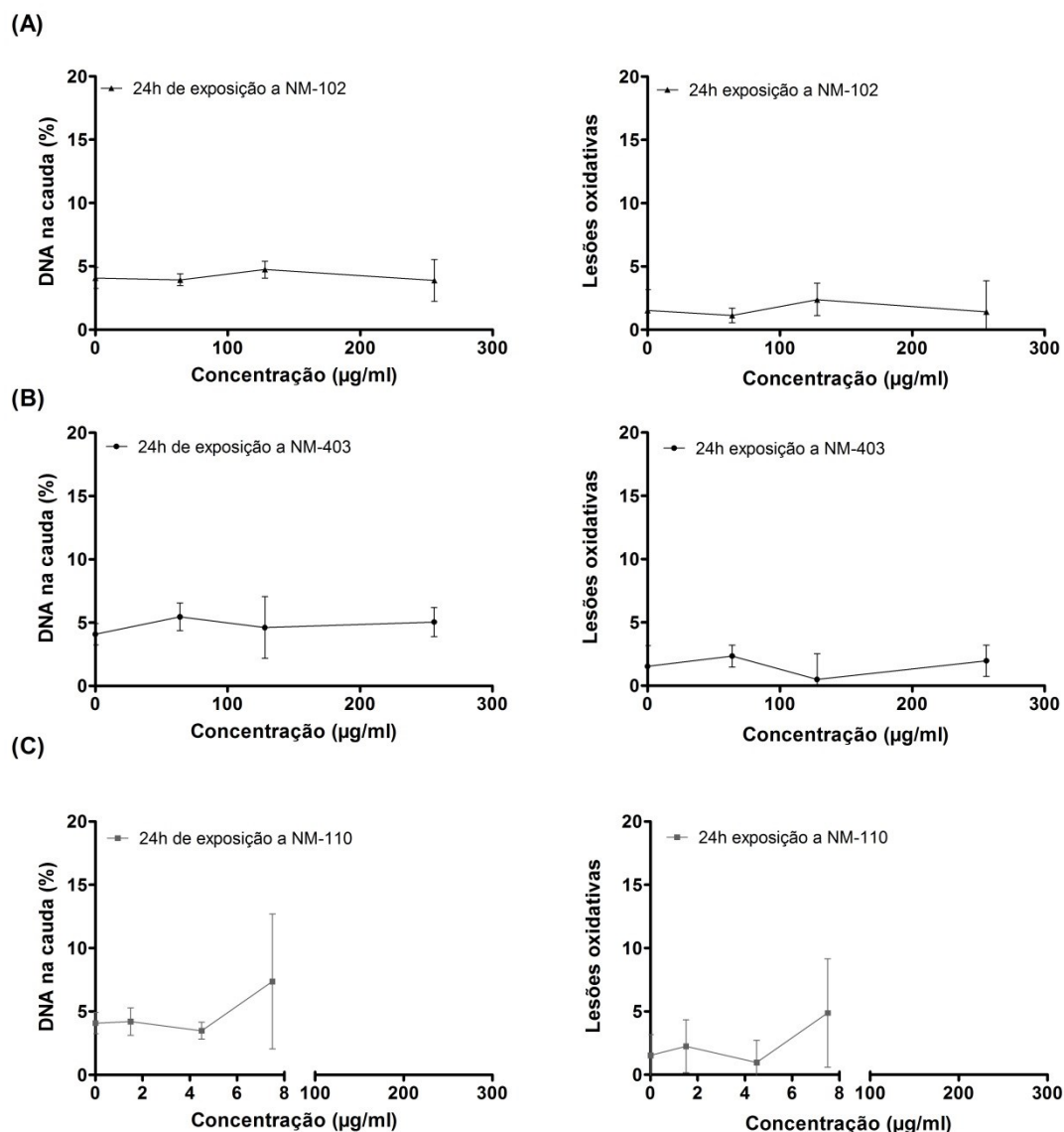


Figura 53. Resultados do ensaio do cometa modificado com FPG, obtidos em células BEAS-2B expostas 24h a cada NM: (A) NM-102; (B) NM-403; (C) NM-110. Os resultados constam nas Tabelas em apêndice.

Assim verifica-se que muito embora as lesões no DNA sensíveis a FPG sejam elevadas no caso do controlo positivo (peróxido de hidrogénio; resultados em apêndice), estas não são relevantes no caso dos NMs estudados, na gama de concentrações analisadas e nas células BEAS-2B.

Os resultados do ensaio do cometa modificado com FPG, em células A549 expostas a NM-102, NM-402 e NM-403, após 3 ou 24h de exposição apresentam-se na Figura 54.

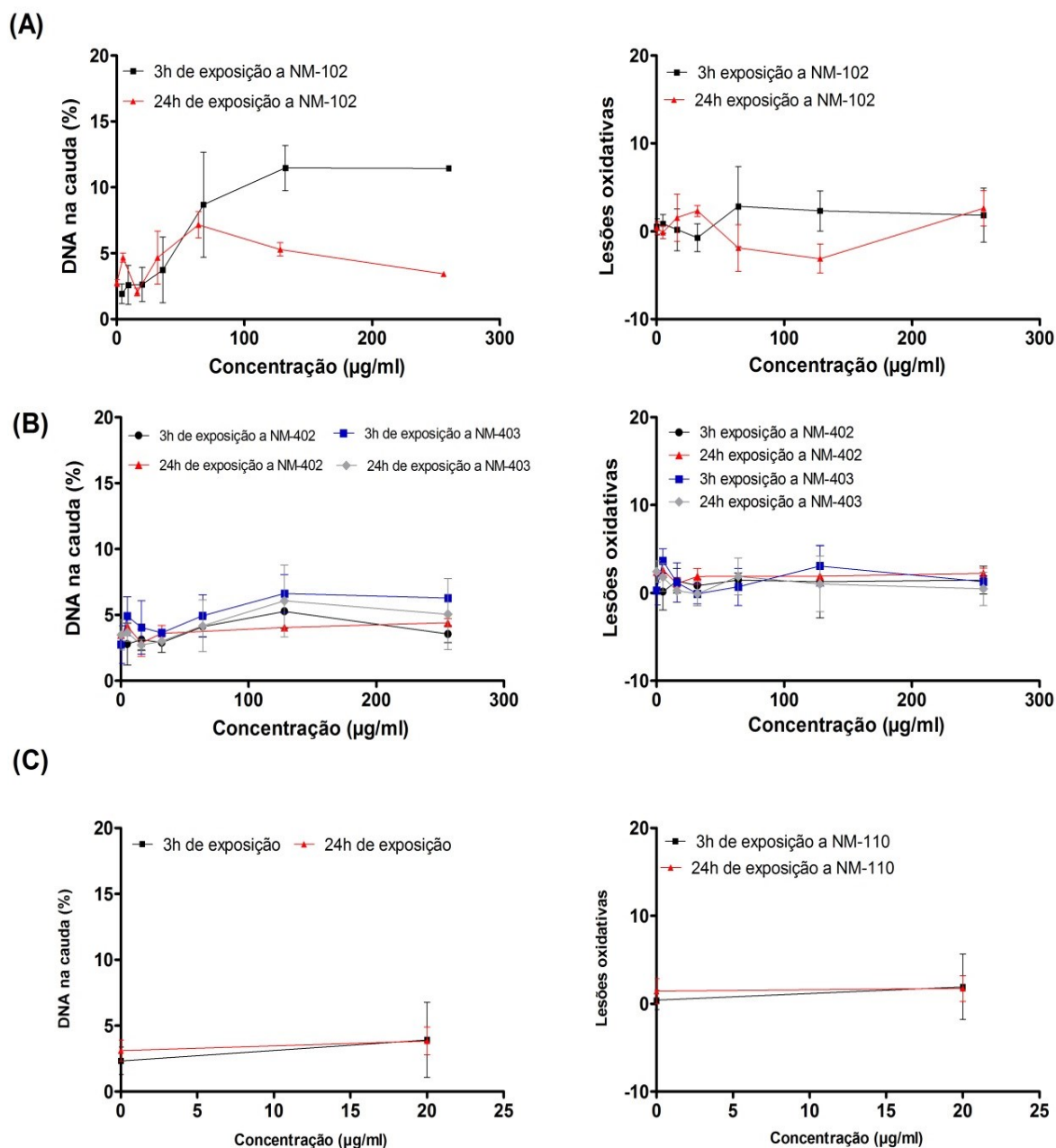


Figura 54. Resultados do ensaio do cometa modificado com FPG, em células A549 expostas a (A) NM-102; (B) NM-402 ou NM-403; (C) NM-110 e controles positivos, relativamente a 3h ou 24h de exposição. Significativamente diferente dos controles *.* Significativamente diferente do controlo negativo ($p \leq 0,053$ teste t -Student, após 3h de exposição). Os resultados constam nas Tabelas em apêndice.

Embora não de detectassem diferenças significativas na percentagem de DNA na cauda 3h ou 24h após o tratamento com as concentrações de NM-102, os resultados após exposição a NM-102 por 3h sugerem um efeito dose-resposta que pode ser descrito pela equação (função quadrática):

$$Y = -0,00031X^2 + 0,1181X + 1,461$$

obtendo-se um valor de $R^2 = 0,857$ e $p < 0,05$ no teste ANOVA e teste t -Student do declive.

Porém, do mesmo modo que foi referido no ensaio do cometa sem FPG, a dose- resposta observada às 3h de exposição não deve ser muito valorizada uma vez que se observou depósito de agregados sobre os nucleoides, que poderão interferir com a medição.

Após 24h de tratamento com NM-102 não havia efeitos estatisticamente significativos. Do mesmo modo, não havia diferenças após a exposição por 3 ou 24h a NM-402, NM-403 ou NM-110 comparativamente ao controlo (Figura 54).

Comparando os resultados do ensaio do cometa com e sem utilização de FPG, obtém-se a contribuição das lesões oxidativas, como se ilustra também na Figura 54. Conclui-se que não se detectaram níveis relevantes de lesões oxidativas induzidas pelo TiO_2 e pelos NTCs, nas condições testadas, nas células A549. No entanto, no controlo positivo, peróxido de hidrogénio (resultados em apêndice), verificou-se um nível de lesões oxidativas no DNA muito superior, demonstrando-se o funcionamento deste ensaio.

7.3. Caracterização da genotoxicidade de nanomateriais *in vivo*

7.3.1. Ensaio do micronúcleo em sangue periférico

A análise de micronúcleos em sangue periférico, 42h após a última injeção de NM-102, revelou que a exposição aos NMs não causou aumento significativo de micronúcleos em eritrócitos imaturos ou maduros (Figura 55A). Também não se verificou alteração na percentagem de eritrócitos imaturos, revelando que não ocorreu toxicidade medular (Figura 55B).

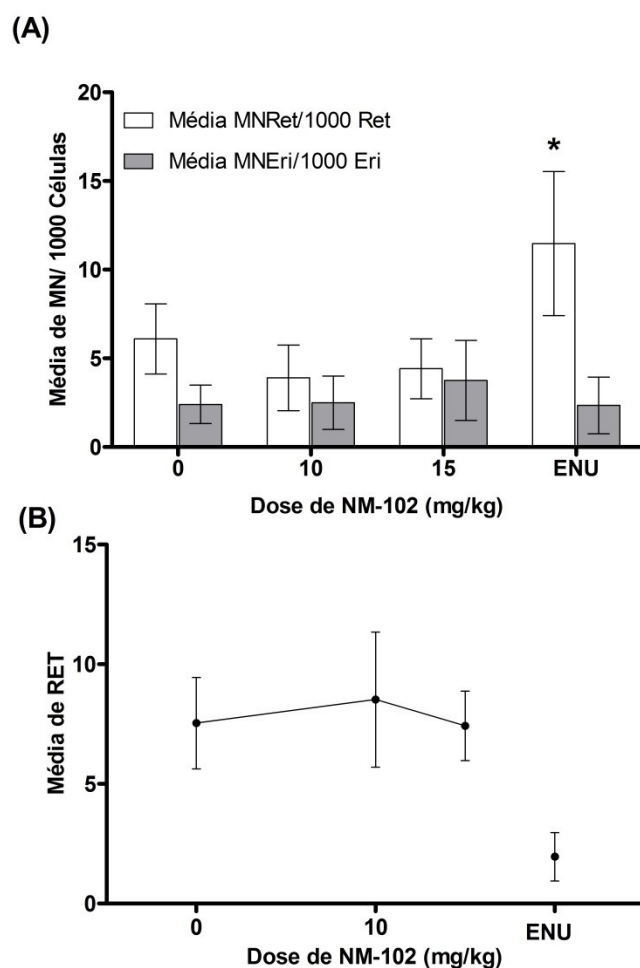


Figura 55. Resultados da análise de micronúcleos em eritrócitos de ratinho expostos a NM-102, 42h após a última injeção. (A) Micronúcleos (MN) em reticulócitos (Ret) e em eritrócitos (Eri); (B) Percentagem de reticulócitos entre os eritrocitos totais. ENU- etilnitrosureia (controle positivo). * Significativamente diferente do controlo negativo ($p < 0,001$, teste χ^2).

No entanto, o controlo positivo induziu um aumento significativo de micronúcleos ($p < 0,0001$) com concomitante mielotoxicidade, revelada na redução de eritrócitos imaturos.

7.3.2. Ensaio de cometa em órgãos de ratinhos

O ensaio do cometa foi realizado 28 dias após exposição dos ratinhos, tendo sido analisados dois órgãos, o fígado e o baço.

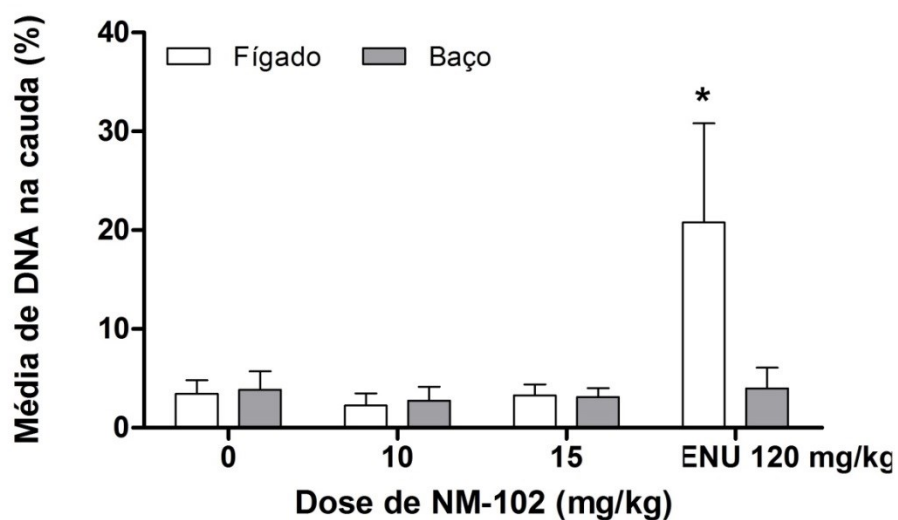


Figura 56. Resultados do ensaio do cometa em células do fígado e baço de ratinhos expostos a NM-102, 28 dias após a última injeção. * Significamente diferente do controlo negativo ($p < 0,05$; teste de Mann-Whitney).

Não se verificaram diferenças significativas no nível de danos no DNA, em nenhum dos dois órgãos analisados. Porém, foi detectado um aumento significativo no fígado dos ratinhos expostos ao controlo positivo ($p = 0.008$, teste de Mann-Whitney).

7.3.3. Mutações no transgene LacZ

Nestes mesmos órgãos, foi realizada a análise da frequência de mutantes e os resultados apresentam-se na Tabela 30.

Tabela 30. Frequência de Mutantes (FM) no fígado e no baço de ratinhos submetidos a duas injeções de 0, 10 ou 15 mg/kg de NM-102 com 24h de intervalo.

Fígado					Baço				
Dose (mg/kg)	Total de colónias (x10 ³)	Colónias Mutantes	FM (x10 ⁻⁵)	Média FM ± DP	Total de colónias (x10 ³)	Colónias Mutantes	FM (x10 ⁻⁵)	Média FM ± DP	FM
0	672	92	13,7	11,9±2,3	532	23	4,3	7,4±4,0	
	801	68	8,5		309	14	4,5		
	108	79	13,8		550	44	8,0		
	680	87	12,8		ND	ND	ND		
	571	61	10,7		475	61	12,8		
2 x 10	513	73	14,2	11,5±2,9	233	26	11,2	10,3 ± 3,4	
	385	38	9,9		146	11	7,5		
	1032	121	11,7		335	53	15,8		
	315	45	14,3		336	30	8,9		
	108	8	7,4		176	14	8,0		
2 x 15	254	24	9,4	9,3±1,7	266	21	7,9	11,3±3,2	
	224	17	7,6		201	22	10,9		
	472	55	11,7		146	12	8,2		
	314	29	9,2		100	11	11		
	230	17	7,4		863	139	16,1		
	614	66	10,7		253	35	13,8		
Controlo Positivo	432	216	50,0	51,0*±9,4	149	136	91,3	83,1*±28,4	
	230	36	39,1		243	104	42,8		
	385	180	46,8		ND	ND	ND		
	162	89	54,9		226	247	109,3		
	378	243	64,3		407	363	89,19		

* Significativamente superior aos controlos ($p < 0,022$, teste de Mann-Whitney).

Não se verificou aumento significativo da FM nem no fígado nem no baço dos ratinhos expostos a NM-102, mas verificou-se um aumento significativo nos dois órgãos dos ratinhos expostos ao controlo positivo ($p = 0,009$ no fígado e $p = 0,021$ no baço, teste de Mann-Whitney).

7.4. Bioacumulação dos nanomateriais *in vivo*

De modo a verificar que, no modelo de ratinhos e nas condições de exposição utilizadas no estudo presente, os NMs atingiam os órgãos alvo, foi efetuada a análise histopatológica e citológica de amostras do fígado nos animais em estudo.

A análise histopatológica (colaboração com Pedro Costa, IMAR e INSA), revelou que efetivamente os NMS atingiam o fígado e persistiam neste órgão em todos os ratinhos expostos a qualquer das doses de NM-102, pelo menos até 28 dias após exposição (Figura 57).

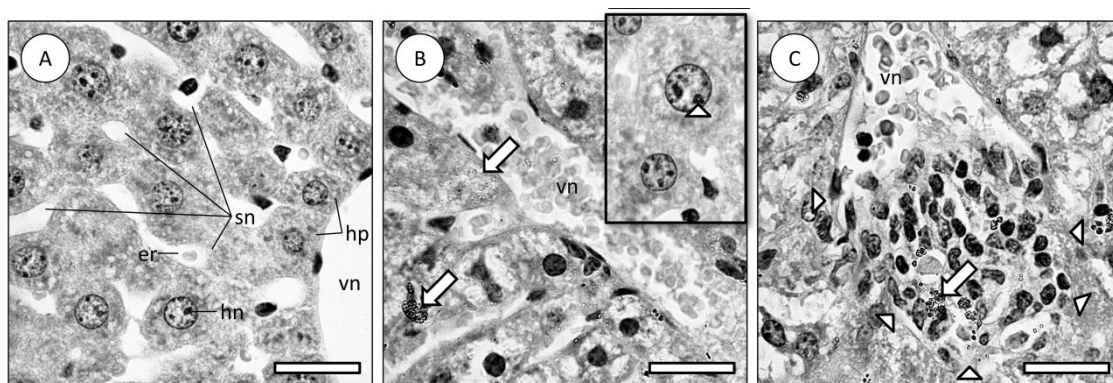


Figura 57. Secções histológicas do fígado dos ratinhos do presente estudo (H&E). (A) Fígado de ratinho de controlo revelando hepatócitos normais (hp) com núcleos concêntricos (hn), em redor de uma vênula hepática (vn) de onde se ramificam sinusóides (sn). As células sanguíneas consistiam em alguns eritrócitos dispersos (er). (B) Secção de fígado de ratinho exposto a 15 mg/kg NM-102, com muitos NMs (incolores), dispersos nos hepatócitos (seta em cima) ou formando aglomerados (seta em baixo). Ampliação: núcleo de um hepatócito com aglomerados de NMs particles na heterocromatina (seta). (C) Secção de fígado de ratinho exposto a 15 mg/kg NM mostrando agregação e infiltração de leucócitos e vênula congestionada com sangue (vm). Notem-se os aglomerados de NMs nos leucócitos (seta). Escala: 25 µm. Fonte: Pedro Costa.

Observavam-se NMs dentro ou entre os hepatócitos, bem como no interior dos macrófagos (incluindo células Kupffer; Figura 57B). Os NMs eram mais numerosos nos ratinhos expostos à dose mais elevada e alguns localizavam-se no interior do núcleo dos hepatócitos.

Para além de confirmar a bioacumulação de NM-102 no fígado, a análise histopatológica revelou uma morfologia hepática normal nos ratinhos de controlo, bem como no fígado dos 5 ratinhos expostos à dose mais baixa. Nos ratinhos expostos à dose mais elevada existiam alguns focos de hiperanemia (fluxo sanguíneo acrescido) e infiltração leucocitária, sugerindo uma resposta inflamatória moderada (Figura 57C).

Para pesquisar a localização celular dos NMs no fígado dos ratinhos onde estes forma observados, utilizou-se ainda análise por microscopia electrónica de transmissão (TEM; colaboração com Elsa Alverca, do Departamento de Saúde Ambiental e Ocupacional do INSA). Apresentam-se na Figura 58 algumas microfotografias ilustrativas do estudo.

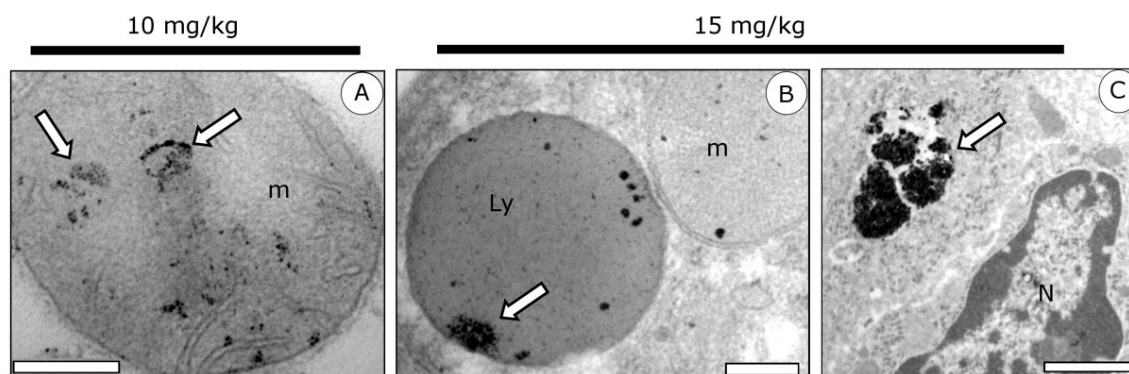


Figura 58. Microfotografias de células do fígado de ratinhos expostos a 10 mg/kg (A) ou 15 mg/kg de NM-102 (B, C). (A) Hepatocito apresentando NMs (setas) no interior do mitocondrio (m); (B) aglomerados no interior de um lisossoma (Ly, setas). Escala: 0.2 μ m. (C) Aglomerados numa vesícula no interior de uma célula de Kupffer (setas).Escala 1 μ m. Fonte: Elsa Alverca.

A análise ultraestrutural revelou a presença de depósitos electrodensos compatíveis com a acumulação de NMs em ratinhos expostos a ambas as doses (Figura 58). Os NMs foram observados na forma dispersa no citoplasma das células e também acumulados nas mitocôndrias. Nos ratinhos expostos à dose mais elevada, os NMs eram visíveis nos hepatócitos. No entanto apenas foi possível analisar alguns animais deste estudo, devido a um problema técnico que inviabilizou a prossecução da análise.

8. DISCUSSÃO

O objetivo principal do presente estudo foi caracterizar os efeitos genotóxicos associados com a exposição a nanomateriais manufaturados, de forma a contribuir para a avaliação de segurança dos NMs. Embora exista um grande volume de trabalhos descritos na literatura com objetivo semelhante, existem muitos resultados contraditórios e a comparação dos diversos estudos é dificultada por diferenças na execução experimental, designadamente quanto à preparação dos NM e vias de exposição, que podem ser determinantes na interpretação do resultado obtido nos ensaios biológicos. Por esse motivo, o Joint Research Center propõe a aplicação de metodologias de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* recorrendo a nanomateriais bem caracterizados quanto às suas propriedades físico-químicas, bem como no meio biológico em que são utilizados (JRC, 2011a). De acordo com essa orientação, o presente estudo foi desenhado com base na utilização de uma combinação de ensaios de genotoxicidade bem padronizados, *in vitro* e *in vivo*, para a avaliação de potenciais efeitos genotóxicos de NMs que foram previamente caracterizados em relação às suas propriedades físico-químicas.

8.1. Interferência dos Nanomateriais Manufaturados nos ensaios biológicos

Verifica-se que as propriedades físico-químicas dos NMs relevantes para a toxicologia podem ser modificadas quer com o método de produção, processo de preparação ou com o armazenamento ou mesmo quando introduzidas no meio fisiológico, ou no organismo (Oberdörster, 2010). Assim, a caracterização detalhada de factores como a dimensão, área superficial, forma, composição, solubilidade e aglomeração dos NMS são fundamentais na correta interpretação de um ensaio toxicológico (Stone *et al.*, 2009).

A interferência de fatores deste tipo conduz a várias dificuldades técnicas na execução e interpretação dos ensaios biológicos com NMs, algumas das quais foram identificadas neste estudo e descritas nos resultados apresentados. Sucintamente, essas dificuldades são enunciadas na Tabela 31.

Tabela 31. Algumas dificuldades identificadas na execução dos ensaios biológicos utilizando NMs.

Dificuldades na interpretação dos ensaios biológicos com NMs

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">- Muitas variáveis nas características dos NMs: forma, área superficial, carga, modificações de superfície, presença de impurezas, interação com a matriz.- Agregação/aglomeração dos NMs em suspensão e no meio de exposição.- Adsorção dos NMs aos nutrientes do meio de ensaio e às células em cultura.- Métrica de dose mais relevante para o parâmetro em estudo.- Interferência do NM com os produtos químicos indicadores do ensaio e/ou com a detecção espectrofotométrica.- Interferência visual na análise de lâminas microscópicas, especialmente em concentrações mais elevadas. |
|---|

No sentido de reduzir este tipo de interferências, no contexto da Ação Concertada NANOGENOTOX, a morfologia e dimensões dos NMs em estudo foram previamente determinadas por outros participantes do projeto e sendo descritas nas Tabelas 25 e 26. É visível nestas tabelas que os NMs do mesmo grupo, ainda que relativamente semelhantes, apresentam algumas variações nas suas características físico-químicas, aspeto esse que foi considerado na interpretação subsequente dos resultados obtidos para os diversos NMs. Como se discutirá relativamente aos ensaios de citotoxicidade, as características dos NMs condicionam o tipo de ensaio que é possível realizar, na medida em que interferem com os métodos de detecção.

Para além das características intrínsecas do NM, os resultados de um ensaio toxicológico para NMs aglomerados, podem diferir do resultado obtido com dispersões estáveis (OECD, 2012), sendo por este motivo muito importante o método de preparação dos NMs. Um trabalho recente comparou a influência do método de dispersão dos NMs de TiO₂ em ensaios de cito- e genotoxicidade em três linhas celulares, tendo verificado que era determinante para o resultado obtido (Magdolenova *et al.*, 2012a) e assim demonstrando a importância deste aspeto. Por sua vez, verificou-se que nas células BEAS-2B e de mesotelioma pleural maligno a dose intracelular de MWCNT dependia do agente dispersante utilizado, sendo o nível de citotoxicidade e resposta inflamatória correlacionados com a dose intracelular (Haniu *et al.*, 2011). Tendo em conta estas observações, no âmbito do projeto NANOGENOTOX, foi desenvolvido e otimizado um procedimento que permitiu assegurar a dispersão estável dos NMs (Jensen *et al.*, 2011). Este procedimento baseou-se na utilização de uma pequena concentração de proteína para melhorar a dispersão e a sua estabilidade ao longo do tempo, combinada com uma curta

sonicação. A efetiva dispersão de cada um dos NMs analisados foi verificada por outros participantes do projeto NANOGENOTOX, através do método de DLS, tendo sido obtidas com sucesso partículas de dimensões nanométricas, embora ainda fossem detetáveis aglomerados em meio aquoso. De acordo com o procedimento realizado, as dispersões mostraram-se estáveis durante cerca de 1 hora (Jensen et al, 2011), período em que se realizou a exposição das células ou dos ratinhos.

Deve notar-se que estes procedimentos adicionais para melhorar a dispersão dos NMs, permitem melhorar também o nosso conhecimento da dose administrada e do comportamento do NM num sistema *in vitro*, mas poderão não corresponder ao que se verifica num cenário de exposição real *in vivo* (Stones et al, 2009).

Para além disso, apesar de garantida a dispersão dos NMs até ao momento do tratamento, no decurso do período de exposição das células, observou-se que ocorria sedimentação dos NMs sobre estas e, mesmo após substituição do meio de cultura, verificava-se a presença de aglomerados sobre as células, que se mantinham até à preparação final das lâminas. Este fenómeno (documentado por exemplo nas imagens das Figuras 35) corresponde ao comportamento natural dos NMs em meio fisiológico, à semelhança do que sucede quando as células num organismo são expostas ao NM. No entanto, este acontecimento poderia interferir com a determinação realizada no ensaio, enviesando a análise visual pela produção de artefactos, pelo que não pode ser ignorado. Estes aspetos são discutidos em pormenor nas secções seguintes, de acordo com os ensaios realizados.

Relativamente à selecção de concentrações de cada NM, como não se verificou citotoxicidade significativa para a maioria dos NMs (excepto NM-110) a concentração a analisar foi limitada pela sua dispersibilidade, i.e., a máxima concentração que era possível dispersar de um modo homogéneo em água com BSA, que foi 2.56 mg/ml para a maioria dos NMs. Também foi considerada a percentagem mais elevada de dispersão que era possível adicionar às células sem interferência com a capacidade normal de proliferação (10%), conduzindo a uma concentração máxima de 256 µg/ml no meio de cultura. No ensaio em ratinhos, o procedimento de dispersão também limitou a dose máxima que foi possível administrar.

8.2. Citotoxicidade dos nanomateriais *in vitro*

As orientações internacionais relativas a ensaios de genotoxicidade pressupõem também a realização de ensaios de citotoxicidade. Estes têm a função de

permitir a adequada interpretação dos resultados obtidos nos ensaios de genotoxicidade. Esta permissa fundamenta-se no reconhecimento de que células cujo genoma foi danificado em níveis que comprometem o normal funcionamento celular podem ser conduzidas para processos de morte celular (Figura 17). Por exemplo, Virág e Szabo (2002) propuseram um modelo segundo o qual a intensidade do dano no DNA determina o destino das células: sobrevivência, apoptose ou necrose. No caso de lesões moderadas, a ativação de vias de resposta ao stress, nomeadamente envolvendo a enzima poli (ADP-ribose) polimerase (PARP-1), facilita a reparação de DNA e a sobrevivência da célula; lesões mais deletérias ou mais frequentes activam a via apoptótica e lesões excessivas no DNA podem conduzir à sobreativação da PARP-1, consequentemente consumindo os recursos energéticos da célula e levando à necrose (revisto por Louro; Silva, 2011). Através de mecanismos deste tipo, um agente que cause lesões genotóxicas em níveis muito elevados pode ser negativo nos testes de genotoxicidade porque as células danificadas foram eliminadas e, por isso, ser incorretamente classificado como não genotóxico. Usualmente procede-se então à aplicação de ensaios de citotoxicidade prévios à genotoxicidade para determinar o intervalo de concentrações a testar, restringindo-se os ensaios a uma gama de doses que induza no geral menos de 50% de citotoxicidade (ICH, 2012). Seguindo estas orientações, no presente estudo foram também realizados ensaios de citotoxicidade dos NMs nos sistemas experimentais utilizados. No entanto, esta tarefa foi dificultada pela interferência dos NMs com algumas das metodologias de determinação de citotoxicidade.

De facto, recentemente um trabalho de Guadagnini *et al.* (2013) evidenciou precisamente a interferência de algumas características dos NMs, como a composição, dimensão, modificações de superfície e aglomeração numa série de testes de toxicidade *in vitro* vulgarmente utilizados (testes de citotoxicidade de WST-1, MTT, lactato desidrogenase, vermelho neutro, iodeto de propídio, contagem de células). Efetivamente, os NMs e suas características específicas interferem com muitos dos ensaios que são vulgarmente utilizados. Nos ensaios baseados em medições espectrofotométricas, como o vermelho neutro ou MTT, alguns NMs podem ter uma absorção no mesmo comprimento de onda que o composto químico indicador do ensaio (Stone *et al.*, 2009). Isto verificou-se quando se tentou aplicar o ensaio do vermelho neutro aos nanotubos de carbono no âmbito do presente estudo, inviabilizando a determinação pretendida através desta metodologia. Por sua vez, o ensaio alternativo utilizado, baseado na contagem de células após coloração com azul de tripano, não é muito sensível ou reprodutível, sendo adequado apenas para

ensaios em pequena escala, devido à morosidade da contagem manual (Stone *et al.*, 2009). O ensaio clonogénico utilizado para as células A549, apresenta-se como uma alternativa mais fiável, aparentemente sem artefactos quando aplicado aos NMs, muito embora não possa ser aplicado a alguns tipos celulares que, em cultura, não formam colónias definidas, como as células BEAS-2B. Assim, a seleção do método de determinação da citotoxicidade induzida pelos NMs deve ser criteriosamente efetuada para cada tipo de NM e para cada tipo celular em estudo.

Os resultados que foi possível obter sistematizam-se na tabela seguinte, de acordo com os que revelaram propriedades citotóxicas (+) ou não (-).

Tabela 32. Resumo dos resultados obtidos na avaliação da citotoxicidade dos NMs *in vitro*.

Órgão/tecido de origem	Sangue periférico	Epitélio brônquico		Epitélio pulmonar	
Linha celular	Linfócitos primários	BEAS-2B		A549	
Metodologia	CBPI ou RI	CBPI ou RI	Azul de tripano	CBPI ou RI	Clonogénico
TiO₂					
NM-102	-	+	+	-	-
NM-103	-				
NM-104	-				
NM-105	-				
NTC					
NM-402	-			-	+
NM-403	-	-	-	-	+
NRCWE-006	-				
NRCWE-007	-				
ZnO					
NM-110	+	+	+	+	+

Em linfócitos humanos, nenhum dos NMs analisados, excepto o ZnO, revelou ser citotóxico no intervalo de concentrações analisado (5-256 µg/ml). Apenas o NTC NM-403 teve algum impacto ao alterar o valor de RI (mas não de CBPI) numa só concentração (45 µg/ml), não tendo sido possível analisar concentrações superiores devido à formação de grandes aglomerados de NMs que impossibilitaram a análise microscópica.

Entre o conjunto de NMs cuja citotoxicidade foi analisada em linfócitos, não se verificaram diferenças entre NMs do mesmo tipo, sugerindo que, no caso da citotoxicidade, se poderiam generalizar as observações por classe de NM. Porém, alguns estudos não apoiam esta conclusão, uma vez que têm demonstrado que características como a dimensão dos NMs ou modificações de superfície influenciam diferentemente a citotoxicidade dos NMs (e.g. Xiong *et al.*, 2013; Hamzeh; Sunahara, 2013).

Em concordância com os nossos resultados negativos de citotoxicidade, um estudo em linfócitos humanos também não verificou citotoxicidade após exposição a 20-200 µg/ml de TiO₂ (Hackenberg *et al.*, 2011a). Porém, outro estudo utilizando 50-500 µg/ml de TiO₂ observou indução de apoptose dependente da dose (Ghosh *et al.*, 2013). Por sua vez, foi descrito que em linfócitos humanos expostos a MWCNTs em concentrações de 10 ppm ou superiores, se verificavam efeitos citotóxicos, embora a toxicidade fosse inferior à verificada com SWCNTs (Hu *et al.*, 2010). Neste último estudo, os linfócitos mostraram ser mais sensíveis aos NTCs que duas linhas celulares, nomeadamente queratinócitos humanos (HaCaT) e células pulmonares (MSTO-211H). No entanto, os resultados desse estudo não podem ser comparados com os presentes resultados devido às unidades (ppm) em que foi descrita a concentração.

Nas células BEAS-2B, o ensaio do azul de tripano, que avalia a perda de integridade de membrana, permitiu verificar que as concentrações de 128 e 256 µg/ml do TiO₂ NM-102 causam cerca de 50% citotoxicidade, sem efeito dose-resposta identificável. Por sua vez, o RI após exposição das células a NM-102 era significativamente diferente do valor do controlo a partir da concentração de 64 µg/ml, embora correspondesse apenas a cerca de 10% de citotoxicidade. De facto, Xiong *et al.*, observaram efeitos citotóxicos dependentes da concentração de TiO₂ em células BEAS-2B expostas a 10-300 µg/ml (Xiong *et al.*, 2013). Estes autores atribuíram este efeito a um mecanismo baseado na adsorção, desnaturação ou mesmo danos nas biomoléculas (lípidos e proteínas) induzidos pelos NMs. Ambos os ensaios realizados no presente trabalho, bem como o artigo de Xiong *et al.*, sugerem a citotoxicidade do NM-102 em células BEAS-2B. Um estudo utilizando concentrações mais baixas de vários TiO₂ (10- 100 µg/ml) concluiu a ausência de propriedades citotóxicas após a exposição de células BEAS-2B, verificando-se o mesmo efeito em células RLE-6TN e macrófagos THP-1 (Xia *et al.*, 2013). Por outro lado, no presente trabalho o NM-102 não apresentou citotoxicidade em linfócitos ou em células A549 expostas, revelando que estas células são menos sensíveis ao TiO₂ do que as células BEAS-2B. Simon-

Deckers *et al.* demonstrou também a baixa toxicidade do TiO_2 em células A549 expostas a 0,25 -100 $\mu\text{g/ml}$, apesar da sua internalização para o citoplasma (Simon-Deckers *et al.*, 2008). Este facto foi ainda confirmado por Moschini *et al.* (2013) em células A549 tratadas com 1-100 $\mu\text{g/ml}$ de TiO_2 e também Hackenberg *et al.* (2010) não observou citotoxicidade em células primárias da mucosa nasal humana, expostas a esta gama de concentrações de TiO_2 , apesar de se detectarem NMs no citoplasma de 11% das células. Assim, a maior parte dos estudos sugerem a ausência de citotoxicidade do TiO_2 no intervalo de concentrações 1-100 $\mu\text{g/ml}$, embora as concentrações acima de 100 $\mu\text{g/ml}$, como as que foram utilizadas no presente estudo, causem efeitos citotóxicos em células do trato respiratório.

No caso do NTC NM-403, aparentemente não se verificou citotoxicidade nem nos linfócitos nem nas células BEAS-2B nesta amplitude de concentrações. Os NTCs também não produziram efeitos citotóxicos no estudo interlaboratorial de Xia *et al.* (2013), após exposição de células BEAS-2B, RLE-6TN e macrófagos THP-1 a 10 - 100 $\mu\text{g/ml}$. Porém, nas células A549 expostas quer a NM-403, quer a NM-402, o ensaio clonogénico mostrou uma correlação dose-resposta, indicando um efeito citotóxico. Obtiveram-se valores de EC_{50} de 79,30 e 120,13 $\mu\text{g/ml}$ de NM-402 e NM-403, respetivamente, revelando-se o primeiro NM mais tóxico em A549 que o segundo. Ainda assim, também neste tipo celular, dois NMs da mesma classe produziram efeitos citotóxicos relativamente semelhantes, tal como sucedeu nos linfócitos. No entanto, este efeito só foi detectado através do ensaio clonogénico, sugerindo que este ensaio poderá ter maior sensibilidade para deteção de efeitos citotóxicos dos NMs nesta linha celular. Em outros dois estudos também foi observada citotoxicidade em células A549 expostas a 1-100 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNTs (Cavallo *et al.*, 2012; Tabet *et al.*, 2009), embora Tabet *et al.* não tenham observado internalização dos NMs, nem stresse oxidativo para estes NMs com diâmetros na ordem de 20-40 nm. Outros estudos tinham, no entanto, já demonstrado a internalização de MWCNTs com diâmetros na ordem de 10-160 nm pelas células A549 (Simon-Deckers *et al.*, 2008), tendo alguns autores sugerido a possibilidade de mecanismos associados a processos inflamatórios que poderão conduzir à deterioração da membrana plasmática (Hirano *et al.*, 2010).

O ZnO apresentou propriedades citotóxicas em linfócitos, células BEAS-2B e A549. No caso dos linfócitos, a citotoxicidade foi significativamente diferente dos controlos negativos a partir da concentração de 32 $\mu\text{g/ml}$, de acordo com a determinação do CBPI e RI. As células BEAS-2B demonstram uma sensibilidade superior ao NM-110, uma vez que se verificou um acentuado efeito citotóxico com a

concentração de 7,5 µg/ml, visível através da determinação do CBPI e também do ensaio do azul de tripano. Por último, nas células A549, o ensaio do vermelho neutro indicou citotoxicidade a partir da concentração de 32 µg/ml, enquanto o ensaio clonogénico e também a determinação do CBPI e RI mostrou haver já citotoxicidade com a concentração de 20 µg/ml.

A elevada citotoxicidade dos nanomateriais de óxido de zinco é concordante com os resultados da literatura em diversas linhas celulares, como por exemplo, em células de rim humano (Kermanizadeh *et al.*, 2013a), células epiteliais alveolares tipo II de rato ou células BEAS-2B (Xia *et al.*, 2013). Neste último trabalho, verificou-se cerca de 50% de citotoxicidade nas células BEAS-2B expostas a 12 µg/ml de óxido de zinco. Num estudo em linfócitos humanos expostos a concentrações entre 1 e 20 µg/ml de ZnO, não se observou citotoxicidade (Gümüş *et al.*, 2013), à semelhança da nossa observação através do CBPI ou RI. No entanto, no presente estudo, utilizando concentrações superiores de ZnO, observou-se elevada citotoxicidade nos linfócitos humanos. Em células da mucosa nasal humana, a exposição a 50 µg/ml de ZnO induziu citotoxicidade significativa, que foi acompanhada de uma elevada libertação de iões zinco (Hackenberg *et al.*, 2011b). Também Kermanizadeh *et al.* (2013b) verificou a elevada solubilidade do NM-110, sugerindo a possibilidade de a toxicidade do NM-110 ser devida à libertação dos iões Zn^{2+} . Efetivamente, foi demonstrada a indução de espécies reativas de oxigénio pelos iões zinco (Lindahl *et al.*, 1998), embora se reconheça que o zinco é um elemento essencial para o organismo humano. Nas células A549, verificou-se elevada citotoxicidade do ZnO nas concentrações entre 8–18 µg/mL, sendo o valor de $EC_{50} = 13.6$ µg/ml (Lin *et al.*, 2009). Neste último estudo foi verificado um aumento de ROS, embora os iões zinco não parecessem determinantes no aparecimento de ROS. No modelo proposto por Kao *et al.* (2012), a citotoxicidade observada após exposição ao ZnO é explicada pela sua dissolução citosólica que conduz à elevação da concentração intracelular de iões zinco, conduzindo ao colapso da função mitocondrial e subsequente morte celular por apoptose. Efetivamente, o ZnO foi detectado no citoplasma de 10% das células da mucosa nasal expostas, enquanto a penetração no núcleo foi observada apenas em 1,5% (Hackenberg *et al.*, 2011b), apoiando um mecanismo de toxicidade associado ao compartimento citosólico.

Devido à elevada toxicidade do ZnO, foram apenas utilizadas as concentrações mais baixas deste NM nos ensaios de genotoxicidade, sendo a sua utilização como controlo positivo nanométrico limitada por este efeito.

Globalmente, conclui-se que a resposta citotóxica aos NMs é modificada não só pelas concentrações do NM, mas também pelo menos, por três fatores identificados no presente trabalho: i) tipo celular analisado, ii) ensaio utilizado para a determinação da citotoxicidade e iii) tipo de NM estudado (se é TiO_2 , MWCNT ou ZnO).

Assim, para NMs onde o efeito citotóxico não é muito acentuado, a modificação da linha celular ou do ensaio utilizado, tem impacto no resultado final obtido. Foi o que se verificou no caso dos NMs insolúveis, TiO_2 e MWCNTs. Porém, no caso dos NMs onde o efeito citotóxico é acentuado, como no óxido de zinco, seja qual for o tipo celular ou ensaio, o resultado foi sempre positivo. Relativamente aos NMs que apenas foram analisados em um tipo celular ou com um ensaio, não pode ser assegurada a inexistência de propriedades citotóxicas pois os resultados sugerem que seguirão o mesmo tipo de comportamento que os outros TiO_2 e MWCNTs. Por este motivo serão necessários mais estudos da citotoxicidade em outros tipos celulares e recorrendo a outros métodos.

8.3. Genotoxicidade dos nanomateriais *in vitro*

A informação sobre a genotoxicidade dos NMs é de extrema importância para assegurar a segurança destes para a saúde humana, uma vez que a sua aplicação em diversos produtos de consumo e biomedicina se encontra em expansão. Embora muitos estudos recentes (revistos no Enquadramento Teórico) tenham procurado investigar a sua genotoxicidade, existem muitos resultados e conclusões contraditórias, possivelmente relacionadas com variações nas características físico-químicas dos NMs, meios de dispersão, sistemas experimentais utilizados, etc. Assim, a utilização de NMs bem caracterizados e metodologias padronizadas e validadas é fundamental para adequada avaliação de segurança. Procurando controlar estes aspetos, neste estudo foi avaliada a genotoxicidade de um conjunto de NMs de TiO_2 e NTCs, que foram obtidos seguindo as boas práticas laboratoriais (GLP) e que podem ser utilizados como referência (repositório do Joint Research Centre).

O desenho do estudo envolveu dois ensaios de genotoxicidade *in vitro*: o ensaio do micronúcleo, para deteção danos cromossómicos, e o ensaio do cometa, para determinação de quebras de cadeia simples ou dupla no DNA. Ambos os ensaios

têm sido amplamente utilizados em nanotoxicologia (revistos em Hillegass *et al.*, 2009).

O ensaio do micronúcleo *in vitro* em células de mamífero ou em linfócitos humanos, como foi referido anteriormente, é um método aceite e validado para efeitos regulatórios, de acordo com a orientação 487 da OECD (2010), sendo um biomarcador geralmente aceite como indicador do risco de cancro (Bonassi *et al.*, 2011). Este ensaio recorre ao bloqueio da citocinese através da adição de citocalasina B à cultura celular, um agente inibidor da polimerização da actina que é essencial à formação do anel de microfilamentos que estreita o citoplasma entre os núcleos das células em divisão durante a citocinese, conduzindo à formação de células com mais de um núcleo (Fenech, M., 2000). Porém, a citocalasina B é também um inibidor da endocitose, pelo que tem sido questionado se a sua adição no decurso do ensaio do micronúcleo poderá impedir a entrada dos NMs na célula. Por este motivo, a exposição das células em cultura aos NMs foi realizada 6h antes da adição da citocalasina. Embora as orientações da OECD para o ensaio do micronúcleo recomendem a remoção do agente em teste antes da adição da citocalasina, evitando interações entre os dois, no caso dos NMs a sua remoção total não é possível, pois ficam adsorvidos às células mesmo depois de lavagens. No presente estudo foi assim utilizado um protocolo do ensaio do micronúcleo modificado pela exposição ao NM anteriormente à adição de citocalasina e sem a remoção do NM nessa altura. Outros autores demonstraram a sensibilidade do ensaio realizado nestas condições para detectar a genotoxicidade de NMs (Magdolenova *et al.*, 2012b).

No caso do ensaio do micronúcleo em linfócitos de sangue periférico humano, verificou-se alguma variabilidade na frequência de micronúcleos observada nos controlos. Tal variação reflete possivelmente diferenças inter-individuais uma vez que, para cada NM, foi utilizada uma amostra de sangue de doadores diferentes. Ainda assim, em todos os casos os resultados do controlo negativo situavam-se dentro dos valores históricos obtidos no mesmo laboratório utilizando este ensaio. Os valores, entre 5 e 11 CBMN/1000 CB, encontram-se abaixo do valor de 16/1000 recomendado por Van Hummelen e Kirsch-Volders (1990).

No presente estudo, observou-se um aumento da dimensão dos aglomerados visíveis com a concentração do NM, durante a análise microscópica das preparações no ensaio do micronúcleo, dificultando a análise efetuada (Figura 35). Embora os NMs depositados nas células fossem facilmente distinguidos dos micronúcleos, a ocultação de células interferia na visualização. Tal interferência pode ser a causa da ausência de um efeito dose – resposta nítido para muitos NMs e também ter contribuído para a

variabilidade nas contagens realizadas entre réplicas da mesma exposição. No entanto, este tipo de comportamento dos NMs aparenta ser inevitável em meio fisiológico.

No caso da obtenção de resultados equívocos, as orientações de OECD relativas ao ensaio do micronúcleo preconizam testes adicionais (OECD, 2010). Dois NMs (NM-102 e NM-402) originaram resultados equívocos, uma vez que apenas uma das concentrações induziu um aumento estatisticamente significativo em comparação com o controlo. Para estes dois NMs, foram analisadas mais células: 6000 para o NM-102 e 4000 para o NM-402, mas os resultados não se alteraram.

O ensaio do cometa, que deteta quebras na cadeia de DNA em células isoladas, é considerado um indicador de lesões pré-mutagénicas, que tem sido amplamente utilizado para estudos sobre os mecanismos subjacentes à genotoxicidade (EFSA, 2012), apresentando a vantagem, em relação ao ensaio do micronúcleo, de se aplicar em células que não estão em divisão. Tem no entanto a desvantagem de detetar lesões primárias não fixadas (Stones *et al.*, 2009), sendo que as lesões detetadas poderão ser reparadas ou as células poderão ser eliminadas. Para além disso, este ensaio não tem sensibilidade para detectar aneugénese, i.e., perda de cromossomas inteiros (Hartmann *et al.*, 2001).

Foi sugerido que o ensaio do cometa com NMs poderia ser afetado por vários aspetos (Magdolenova *et al.*, 2012b; Stone *et al.*, 2009): i) os NMs poderiam ficar associados ao DNA do nucleóide, afetando a sua migração eletroforética; ii) ao manterem-se presos ao nucleóide, os NMs poderiam induzir quebras no DNA “nu” que não ocorreriam nas células intactas; iii) a presença de NMs ou agregados no nucleóide, com propriedades de fluorescência, poderiam afetar a quantificação através de *software* automático; iv) os NMs poderiam interferir com a ação da enzima FPG. Se relativamente a i, ii e iv, estes artefactos não parecem ser relevantes (Magdolenova *et al.*, 2012b), no caso do ensaio do cometa realizado no presente estudo, com TiO₂, verificou-se o artefacto iii), sendo que na imagem da Figura 46 é visível forma como a deposição dos NMs sobre os nucleóides são interpretados pelo sistema de imagem como sendo fluorescência devida a quebras no DNA. Este efeito é mesmo dependente da dose, ainda que o comprimento da cauda do cometa seja próximo de zero, mostrando não existirem danos significativos.

Recorrendo ao ensaio do micronúcleo e ao ensaio do cometa em várias linhas celulares, os resultados permitiram classificar os NMs estudados de acordo com os seguintes critérios (definidos em NANOGENOTOX Joint Action, 2013):

-Positivo “+”: aumento estatisticamente significativo em pelo menos duas concentrações ou um aumento estatisticamente significativo na dose alta e uma relação dose-resposta;

-Equívoco “(+)”: aumento estatisticamente significativo em uma concentração, sem relação dose-resposta e

-Negativo “-”.

Os resultados obtidos foram assim sistematizados na Tabela 33 baseada nesta classificação.

Tabela 33. Resumo dos resultados obtidos na avaliação da genotoxicidade dos NMs *in vitro*.

Orgão/tecido de origem	Sangue periférico	Epitélio brônquico		Epitélio pulmonar	
Linha celular	Linfócitos primários	BEAS-2B		A549	
Metodologia	Micronúcleo	Micronúcleo	Cometa	Micronúcleo	Cometa
TiO₂					
NM-102	(+)	-	+	-	+
NM-103	+				
NM-104	+				
NM-105	-				
CNT					
NM-402	(+)			+	-
NM-403	+	-	-	-	-
NRCWE-006	+				
NRCWE-007	-				
ZnO					
NM-110	+	-	(+)	(+)	(+)

8.3.1. Nanomateriais de dióxido de titânio

Os resultados do ensaio do micronúcleo após exposição dos linfócitos aos TiO₂ NM-103 e NM-104, dois NMs de estrutura cristalina rutilo, sugerem um efeito genotóxico *in vitro*, uma vez que se observaram aumentos significativos da frequência de micronúcleos em várias concentrações, quando comparados com os controles

negativos. No entanto, não foi observado um efeito dose-resposta e o aumento na frequência de micronúcleos não chegou a duplicar o valor obtido para os controles negativos. Na literatura, a maioria dos artigos publicados com ensaios de genotoxicidade em linfócitos e outras linhas celulares humanas descrevem resultados negativos para os TiO₂ rutilo. Em particular, o estudo de Landsiedel *et al.* (2010) analisou a indução de micronúcleos por dois TiO₂ rutilo, de cerca de 50 nm, hidrófobos, um deles modificado com um copolímero de dimeticone/meticone e outro com polímero de silano e verificou a inexistência de genotoxicidade numa gama de concentrações semelhantes à do presente estudo (75- 300 µg/ml; Landsiedel *et al.*, 2010). Contudo não se conhecem estudos sobre a indução de micronúcleos pelos rutilo modificados NM-103 (hidrofóbico, com dimeticone) e NM-104 (hidrófilo, com glicerina).

O NM-105, constituído por uma mistura de estruturas cristalinas anatase e rutilo (85%-15%), que corresponde ao TiO₂ cujos aglomerados tomam maior dimensão de entre os quatro TiO₂ estudados, não induziu micronúcleos nas condições analisadas. Na literatura, estudos anteriores com linfócitos humanos *in vitro* expostos a um TiO₂ semelhante ao NM-105 (70% anatase, 30% rutilo) tinham descrito uma indução de micronúcleos dependente da dose (20-100 µg/ml) e resultados positivos no ensaio do cometa (Kang *et al.*, 2008). Utilizando a mesma forma de TiO₂ (70% anatase, 30% rutilo), Jaeger *et al.* mostraram a indução de micronúcleos em queratinócitos humanos (HaCaT) expostos a concentrações entre 0.5 e 50 µg/ml (Jaeger *et al.*, 2012). Mais recentemente, Magdolenova *et al.* (2012a) demonstraram a genotoxicidade de concentrações baixas de NM-105 (0-75 µg/cm²) em células linfoblastoides humanas (TK6), fibroblastos de rim de macaco (Cos-1) e células epiteliais embrionárias (EUE), utilizando a versão modificada do ensaio do cometa com FPG. Este resultado, que era dependente do procedimento utilizado para a dispersão dos NMs, sugere a contribuição das lesões oxidativas para a genotoxicidade do NM-105. Também uma mistura de anatase-rutilo, em que o rutilo predominava, mostrou ser genotóxica em fibroblastos murinos (Balb/3T3) e em fibroblastos de pulmão de hamster chinês (V79), no ensaio do micronúcleo e do cometa (Roszak *et al.*, 2013). Assim, embora a maioria dos estudos com misturas de anatase e rutilo, indiquem os seus efeitos genotóxicos, os presentes resultados não verificaram esta tendência.

Por sua vez, o NM-102, forma anatase, causou um aumento significativo de 1,5 vezes na frequência de micronúcleos em linfócitos, apenas na concentração de 125

$\mu\text{g/ml}$. Uma forma de TiO_2 anatase ($< 25 \text{ nm}$, semelhante a NM-102) tinha sido descrita como causando um aumento dependente da dose na frequência de aberrações cromossômicas, numa amplitude de concentrações semelhantes às do presente estudo ($12,5\text{-}300 \mu\text{g/ml}$; Catalán *et al.*, 2012). Porém, as concentrações de $20\text{-}200 \mu\text{g/ml}$ do mesmo NM não induziram lesões no DNA detetáveis pelo ensaio do cometa em linfócitos humanos (Hackenberg *et al.*, 2011a). No último estudo, os autores demonstraram, utilizando TEM, que a maioria dos linfócitos não permitia a entrada do TiO_2 na célula. A confirmar-se, esta observação pode indicar que os efeitos genotóxicos observados nos outros estudos tenham sido mediados indiretamente, e.g., pela influência sobre a membrana celular ou através dos monócitos presentes nas culturas de sangue total (Catalán *et al.*, 2012).

Por outro lado, quando as células do epitélio brônquico humano (BEAS-2B) e de adenocarcinoma epitelial de pulmão humano (A549) foram expostas a NM-102 não se verificou aumento significativo da frequência de micronúcleos. Em vez disso, verificou-se uma redução significativa da frequência de micronúcleos, que ocorria em paralelo com uma redução significativa do RI, sugestivo de que estaria a ocorrer citotoxicidade nestas concentrações, sendo eliminadas possivelmente as células mais lesadas. Efetivamente, a correlação entre a frequência de micronúcleos e o RI foi explorada através de regressão linear, que se apresenta na Figura 70:

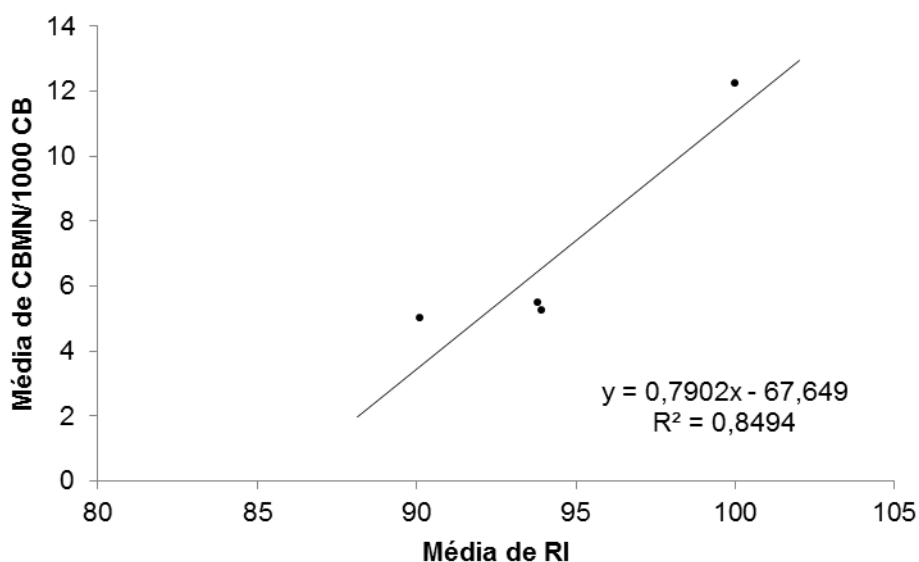


Figura 59. Relação entre a citotoxicidade e a genotoxicidade determinados através do ensaio do micronúcleo em células BEAS-2B expostas a $0\text{-}256 \mu\text{g/ml}$ de NM-102.

Assim, uma vez que o RI diminui quando existe maior citotoxicidade, e que se verifica uma correlação directa entre a média de RI e de frequência de micronúcleos em células BEAS-2B expostas a NM-102, podemos afirmar que são detectados mais micronúcleos quando a citotoxicidade é menor. Possivelmente um aumento da concentração irá conduzir a maior citotoxicidade que impedirá de detectar os micronúcleos devido à remoção das células demasiado danificadas. No entanto, esta observação deverá ser mais investigada.

Considerando o ensaio do cometa, foi observada uma relação dose-resposta nas células A549 e BEAS-2B, apesar de o nível de lesões se situar em valores muito reduzidos. Contudo, este resultado aparenta estar sujeito a alguma interferência da presença dos NMs com a metodologia, conforme foi discutido anteriormente, pelo que não se deverão tirar conclusões.

De um modo geral, cerca de metade dos artigos publicados *in vitro* com linfócitos e com outras linhas celulares humanas descrevem a genotoxicidade do TiO₂ anatase (Tabelas 11 e 12). Em estudos com células BEAS-2B, as formas de TiO₂ anatase (10 nm, <25 nm e 200 nm) induziram micronúcleos (Falck *et al.*, 2009; Gurr *et al.*, 2005), enquanto as formas rutilo não tiveram tal efeito (Falck *et al.*, 2009). Rahman *et al.* (2002) sugeriram que os micronúcleos induzidos por TiO₂ (≤20 nm; fase não especificada) em células de hamster sírio (SHE) eram cinetocoro-negativas, portanto correspondiam a um efeito clastogénico.

Embora tenha já sido demonstrada a capacidade de os linfócitos internalizarem os TiO₂ (Zhu *et al.*, 2012) assim como as células BEAS-2B (Bhattacharya *et al.*, 2009) e as células A549 (Stearns *et al.*, 2001), não deve excluir-se a possibilidade de que as condições experimentais utilizadas não tenham permitido a entrada do NM-102 nos tipos celulares estudados. Ainda será confirmada a internalização do NM-102 por parte das células A549 através de TEM, que não foi possível realizar até à data devido a avaria no microscópio, apesar de as amostras se encontrem conservadas para esse fim.

O presente resultado obtido para o NM-102, fracamente positivo nos linfócitos e negativo nas restantes linhas celulares, sugere que o NM-102 não é genotóxico *in vitro*. Uma vez que este resultado *in vitro* necessitava de esclarecimento para concluir sobre a sua segurança prosseguiu-se para um ensaio *in vivo*.

8.3.2. Nanotubos de carbono de parede múltipla

No presente estudo foi observado um aumento da frequência de micronúcleos em linfócitos humanos após a exposição a dois dos quatro MWCNTs analisados. O MWCNT espesso e longo (69 nm de diâmetro, 4423 nm de comprimento), NRCWE-006, mas também o MWCNT fino e curto (11 nm de diâmetro, 394,3 nm de comprimento), NM-403, produziram efeitos genotóxicos naquele tipo celular. No entanto, o NRCWE-007, igualmente fino e curto (15 nm de diâmetro e 369 nm de comprimento) revelou-se negativo neste sistema experimental. Assim, as diferenças verificadas na genotoxicidade entre dois MWCNTs muito semelhantes não podem ser explicadas pela variação no diâmetro ou no comprimento do nanotubo. Outras diferenças estruturais, como a atividade superficial ou a presença de metais de transição como impurezas poderão ser a causa da diferente genotoxicidade destes MWCNTS (Joint Research Centre, 2011; Lindberg *et al.*, 2009). Relativamente ao NM-403, nas linhas celulares BEAS-2B e A549 não induziu um aumento significativo de micronúcleos nem de quebras de DNA no ensaio do cometa.

Deve salientar-se que o NRCWE-006, que foi positivo no presente estudo, é o mesmo NM que induziu mesotelioma após injeção intraperitoneal em ratinhos (3-3000 µg/animal) e em ratos (2×0.5 mg/animal) (Nagai *et al.*, 2011; Takagi *et al.*, 2008, 2012) e injeção intra-escrotal (1 mg/animal) em ratos (Sakamoto *et al.*, 2009). Por sua vez, os estudos em linhas celulares com o NRCWE-006 mostraram um aumento de micronúcleos em A549 (20-200 µg/ml; Kato *et al.*, 2013) mas não em células de pulmão de hamster chinês CHL/IU (testadas até 5 µg/ml; Asakura *et al.*, 2010). Em macrófagos de ratinho (RAW 264.7), ambos os MWCNTs espessos e longos (149 × 5330 nm; 1-100 µg/ml) e finos e longos (10-30×500-50000 nm; 1-10 µg/ml) induziram micronúcleos (Di Giorgio *et al.*, 2011; Migliore *et al.*, 2010). Houve um aumento de micronúcleos em células epiteliais de pulmão RLE e células epiteliais humanas MCF-7 após exposição a MWCNT (10-50 µg/ml; Muller *et al.*, 2008) e a hibridação *in situ* revelou que os micronúcleos nas células MCF-7 se deviam a acontecimentos clastogénicos e aneugénicos. Este MWCNT também produziu micronúcleos *in vivo* em pneumócitos tipo II de ratos expostos por via intratraqueal a 2 mg (Muller *et al.*, 2008). O mesmo efeito foi observado em eritrócitos de medula óssea de ratinhos tratados i.p. com o MWCNT muito fino e muito longo (Ghosh *et al.*, 2011) e com MWCNT funcionalizado e não funcionalizado com o grupo carboxilo (0.25-0.75 mg/kg b.wt; Patlolla *et al.*, 2010). Outros tipos de MWCNTS, uns finos e longos (10-15 × ~20000

nm; 12.5-50 mg/kg b.wt), outros espessos e longos (44 e 70 nm, sem informação sobre o comprimento; 5-20 mg/kg b.w.) não induziram micronúcleos na medula óssea de ratinhos (Ema *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2011).

O NM-402, outro MWCNT fino (espessura 11 nm) e com comprimento de 1141 nm, foi genotóxico nos linfócitos, apenas na dose baixa (15 µg/ml), enquanto nas células A549 induziu um aumento de micronúcleos dependente da concentração, mas não afetou as quebras no DNA detectadas no ensaio do cometa. Estudos descritos anteriormente tinham demonstrado que os MWCNTs de dimensões 20-40×1000–5000 nm (doses em µl/ml, não comparáveis) e 10-30 ×1000-2000 nm (50-300 µg/ml) causavam micronúcleos e aberrações cromossômicas (Cveticanin *et al.*, 2010; Catalán *et al.*, 2012). No caso de um estudo, devido à aglomeração de NM-402 nas células A549, na mesma gama de doses, não foi determinada a frequência de células micronucleadas (Corradi *et al.*, 2012). Porém, obtiveram-se resultados negativos no ensaio do micronúcleo com MWCNT com as mesmas dimensões (10-30×1000-2000 nm) em linfócitos humanos expostos a 1000 µg/ml, (Szendi; Varga, 2008). Também foram descritos resultados negativos em células BEAS-2B expostas a MWCNTs, apesar de ter sido confirmada a entrada do NM nas células (Lindberg *et al.*, 2013).

O processo de aglomeração dos NMs, observado sob condições fisiológicas, pode contribuir para explicar as contradições encontradas na literatura, uma vez que aparenta ser dependente do tempo e da concentração. Como foi anteriormente referido, num estudo verificou-se que a dose intracelular de MWCNT dependia do agente dispersante utilizado e o nível de citotoxicidade e resposta inflamatória correlacionavam-se com a dose intracelular (Haniu *et al.*, 2011). No presente estudo, foi utilizado um procedimento padronizado que foi desenvolvido para garantir a dispersão estável dos NMs, reduzindo a aglomeração e subsequente sedimentação (Jensen *et al.*, 2011). A análise por TEM e por DLS demonstrou que se obtinham partículas com dimensões nanométricas, embora muitos aglomerados ainda fossem observados. Um aumento da dimensão dos aglomerados com a dose, visível nas preparações microscópicas, pode ser responsável pela ausência de um efeito dose-resposta claro, especialmente no caso dos linfócitos expostos a NM-403. Este tipo de dificuldades já foi descrito na literatura por Lindberg *et al.* (2009), Ghosh *et al.* (2010) e Hackenberg *et al.* (2011a). Apesar da interferência com a análise, a aglomeração é comportamento natural dos NMs, relevante para avaliar os seus efeitos biológicos.

Várias abordagens na literatura têm procurado, sem sucesso, obter conclusões sobre a influência das características dos NTCs nos seus efeitos biológicos. Uma

meta-análise da literatura revelou recentemente (Gernand; Casman, 2013) que a influência dessas características pode ser não linear (como no caso da agregação), ou pode ser insignificante (a razão de aspecto) enquanto outras podem ser factores agravantes do efeito (impurezas ou diâmetro do NTC). Anteriormente, Kim *et al.* (2011) tinham já concluído que a razão de aspecto não tinha influência na genotoxicidade dos MWCNTs. Na perspectiva de (Lanone *et al.*, 2013) características como as dimensões, área superficial, biopersistência e formação de “corona” proteica podem ser determinantes da toxicidade dos NTCs, mas a combinação destas propriedades pode ser modificada simultaneamente para um dado NTC, com alteração da sua toxicidade global. Efetivamente, no presente trabalho e à luz do conhecimento atual, não pode ser discernida se existe uma característica determinante da genotoxicidade dos NTCs, como se discute de seguida.

8.3.3. Correlação entre as características dos nanomateriais e a sua genotoxicidade *in vitro*

Foi realizada uma tentativa de correlacionar as características físico-químicas dos NMs estudados com o resultado do ensaio do micronúcleo obtido nos linfócitos expostos a um conjunto de NMs de cada classe. Com base na Tabela 34 pode realizar-se uma apreciação qualitativa entre estas variáveis.

Tabela 34. Comparação entre as características de cada NM descritas em Tavares *et al.*, 2013 de acordo com a evidência de genotoxicidade através do ensaio do micronúcleo em linfócitos.

Genotoxi- cidade	NM	Fase cristalina	Área superficial específica (m ² /g)*	Partículas Primárias			Aglomerados (dimensão média, nm)	Espessura ± DP (nm)	Comprimento Geodésico ± DP (nm)
				Diâmetro mín. ± DP (nm)	Diâmetro máx. ± DP (nm)	Razão de aspecto ± DP			
+	NM-103	Rutilo (hidrofóbico)	51	21.9 ± 1.4	37.9 ± 1.6	1.7 ± 1.3	67	-	-
+	NM-104	Rutilo (hidrofílico)	56	19.0 ± 1.5	25.8 ± 1.4	1.4 ± 1.3	60	-	-
(+)	NM-102	Anatase	78	20.8 ± 1.6	33.0 ± 1.5	1.5 ± 1.3	54	-	-
-	NM-105	Rutilo- anatase	46	20.0 ± 1.3	29.6 ± 1.3	1.4 ± 1.2	90	-	-
+	NM-403	MWCNT	135	-	-	35.6 ± 1.8	-	11.1 ± 1.5	394.3 ± 1.6
+	NRCWE-006	MWCNT	26	-	-	63.7 ± 2.4	-	69.4 ± 1.4	4423.6 ± 2.3
(+)	NM-402	MWCNT	226	-	-	107.1 ± 1.9	-	10.7 ± 1.3	1141.3 ± 2.0
-	NRCWE-007	MWCNT	96	-	-	24.1 ± 1.9	-	15.3 ± 1.5	368.7 ± 2.0

DP-desvio padrão.* NANOGENOTOX, 2013.

Na Tabela 34 verifica-se que, entre os TiO₂ estudados, os mais claramente genotóxicos são os que possuem forma cristalina rutilo, com uma área superficial

muito semelhante, enquanto a forma anatase apresentou efeitos genotóxicos equívocos e a mistura das duas foi negativa.

Recorreu-se à determinação do coeficiente de correlação de Spearman após a verificação gráfica da existência de relação entre as variáveis diâmetro, dimensão dos aglomerados e área superficial com as médias das frequências de CBMN obtidas para as várias concentrações de NMs. Os valores utilizados apresentam-se na Tabela 35, relativamente aos TiO₂.

Tabela 35. Comparação entre as características de cada NM e a média da frequência de micronúcleos em linfócitos.

<i>NM</i>	<i>Área superficial (m²/g)</i>	<i>Diâmetro mín. (nm)</i>	<i>Diâmetro máx. (nm)</i>	<i>Razão de Aspeto</i>	<i>Aglomerados (dimensão média, nm)</i>	<i>CBMN/1000 CB</i>
NM-102	78	20,8	33,0	1,5	54	12,7
NM-102	78	20,8	33,0	1,5	54	12,5
NM-102	78	20,8	33,0	1,5	54	11,3
NM-102	78	20,8	33,0	1,5	54	13,3
NM-102	78	20,8	33,0	1,5	54	8,2
NM-103	51	21,9	37,9	1,7	67	12,3
NM-103	51	21,9	37,9	1,7	67	8,8
NM-103	51	21,9	37,9	1,7	67	11,5
NM-103	51	21,9	37,9	1,7	67	6,5
NM-103	51	21,9	37,9	1,7	67	5,3
NM-104	56	19,0	25,8	1,4	60	6,3
NM-104	56	19,0	25,8	1,4	60	7,8
NM-104	56	19,0	25,8	1,4	60	5,3
NM-104	56	19,0	25,8	1,4	60	6,2
NM-104	56	19,0	25,8	1,4	60	4,2
NM-105	46	20,0	29,6	1,4	90	7,8
NM-105	46	20,0	29,6	1,4	90	8,0
NM-105	46	20,0	29,6	1,4	90	7,5
NM-105	46	20,0	29,6	1,4	90	7,7
NM-105	46	20,0	29,6	1,4	90	7,0
<i>r</i>	0,322	0,528	0,528	0,460	-0,322	-
<i>p</i>	0,166	0,017	0,017	0,041	0,166	-

r - coeficiente de correlação de Spearman, relativamente a CBMN/1000CB; p- probabilidade associada ao teste; NA- não aplicável por não se reunirem os pressupostos do teste.

Considerando as observações para as várias concentrações em conjunto (n=5), existe uma correlação positiva elevada ($r = 0,528$) e significativa ($p = 0,017$) entre o diâmetro dos NMs de TiO₂ e das médias da frequência de CBMN. Esta correlação é apresentada graficamente na Figura 60.

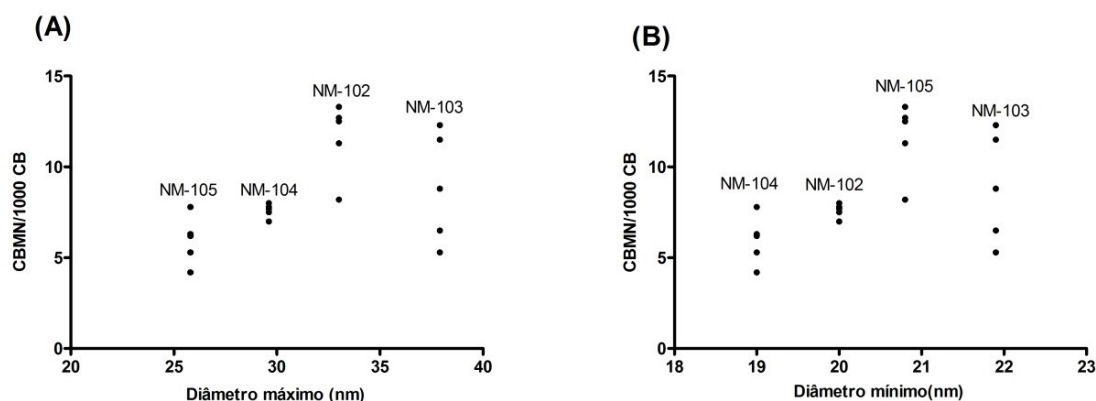


Figura 60. Representação gráfica da correlação entre o diâmetro do TiO₂ e a frequência de micronúcleos em linfócitos humanos.

Embora esta correlação necessite ainda ser confirmada em estudos envolvendo um conjunto mais vasto de NMs, a correlação verificada indicia que os NMs de TiO₂ que apresentam maior diâmetro têm maior indução de micronúcleos. Em princípio, um diâmetro maior impediria a translocação para o interior das membranas biológicas, prevenindo a interação do NM com o genoma. Porém, no caso de a genotoxicidade verificada se dever a um processo inflamatório, o maior diâmetro poderia significar maior indução de inflamação e consequente genotoxicidade secundária.

Por sua vez verificou-se uma correlação positiva moderada ($r = 0,460$) e significativa ($p = 0,041$) entre a razão de aspeto dos TiO₂ e a média da frequência de CBMN. A correlação é positiva, ou seja, quanto maior a razão de aspeto, maior a frequência de MNCB. No entanto, a amplitude de valores da razão de aspeto estudados entre estes NMs era reduzida, sendo claramente inferior aos dos NTCs, reconhecidamente correspondentes a fibras devido à sua elevada razão de aspeto.

Relativamente aos NTCs não emerge um padrão claro ao compararmos as várias características físico-químicas com o resultado da genotoxicidade. De modo análogo ao realizado para os TiO₂, também foi efetuada a análise através do coeficiente de Spearman, mas não foram detectadas correlações significativas entre as variáveis.

Poderá ainda suceder que o principal determinante do efeito genotóxico não seja apenas uma característica, mas antes uma combinação de características. Seria

necessário recorrer-se um painel mais extenso de NMs para poder investigar este aspeto.

Por outro lado, esta tentativa de correlação é questionada pelos resultados distintos que são obtidos em cada tipo celular, sugerindo que a interação do NM com a célula depende não só das suas características mas também das características da célula em questão. Isto sucede também porque o efeito genotóxico não se revela muito intenso nem consistente. Assim, para ser possível concluir inequivocamente sobre as características dos NMs que terão maiores consequências biológicas adversas, serão necessários estudos mais aprofundados envolvendo painéis de NMs diversificados e várias linhas celulares distintas.

8.3.4. Óxido de zinco

O óxido de zinco produziu um efeito fracamente positivo nos linfócitos, correspondendo a um aumento máximo de 1,6 vezes na frequência de micronúcleos na concentração de 64 µg/ml, seguido de decréscimo nas doses mais elevadas, provavelmente devido a toxicidade. A baixa capacidade dos linfócitos permitirem a entrada do óxido de zinco nas células poderá ser uma explicação para esta observação. De facto, o ZnO já foi descrito como sendo genotóxico, induzindo um aumento de 4 a 5 vezes na frequência de micronúcleos nas células A549 (5-50 µg/ml) e em células U87 de glioma (Corradi *et al.*, 2012; Wahab *et al.*, 2011). Os resultados do presente estudo revelaram efetivamente que o ZnO induziu um aumento de cerca de 3 vezes na frequência de micronúcleos nas células A549 expostas a 20 µg/ml deste NM, embora a sua toxicidade tenha inviabilizado a utilização de concentrações mais elevadas nestas células e em BEAS-2B. Efetivamente, a elevada toxicidade deste NM foi anteriormente descrita (Xia *et al.*, 2013) podendo ser causada pela sua solubilidade, com libertação de iões zinco, como anteriormente referido na discussão dos resultados da citotoxicidade.

Na literatura, a maioria dos estudos descritos sugere um efeito genotóxico do ZnO em linfócitos humanos (Gümüş *et al.*, 2013) e outras linhas celulares (Alarifi *et al.*, 2013; Dufour *et al.*, 2006; Gerloff *et al.*, 2009; Hackenberg *et al.*, 2011a; Sharma *et al.*, 2011; Valdiglesias *et al.*, 2013) enquanto poucos estudos referem resultados negativos (Hackenberg *et al.*, 2011; SCSS, 2012; Nam; Kim; Na, 2012).

Embora o ZnO tenha sido inicialmente incluído neste estudo como um candidato a nanomaterial de referência a utilizar no futuro, a sua elevada toxicidade reduziu o intervalo de concentrações em que podia ser utilizado em algumas linhas celulares, não se recomendando assim a sua utilização universal como controlo positivo nanométrico (NANOGENOTOX Joint Action, 2013).

8.3.5. Lesões oxidativas induzidas pelos NMs *in vitro*

Os efeitos adversos mais consensualmente atribuídos aos diversos NMs envolvem a inflamação e a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), muito embora os mecanismos da interação nano-bio ainda se encontrem por esclarecer, devido à sua complexidade. Os mecanismos que conduzem a genotoxicidade foram recentemente revistos por Magdolenova *et al.* (2013). A genotoxicidade pode ser devida à interação direta dos NMs com o material genético, a danos indiretos devidos à produção de ROS ou por libertação de iões tóxicos dos NMs solúveis (revisto em Singh *et al.*, 2009). Poderá ainda ocorrer genotoxicidade secundária mediada por stress oxidativo gerado no decurso de um processo inflamatório devido aos NMs (Stone *et al.*, 2009).

Como vimos até aqui, os resultados obtidos sugerem a existência de efeitos genotóxicos, ainda que fracos, de algumas formas de TiO₂ e MWCNT em células humanas *in vitro*.

É geralmente aceite que os NMs, devido à sua pequena dimensão e elevada área superficial, podem induzir um aumento de ROS intracelulares através de processos químicos e bioquímicos (revisto em Yan *et al.*, 2013). A produção excessiva de ROS intracelular poderá, por sua vez, conduzir ao stress oxidativo se as enzimas antioxidantes não conseguirem compensar esse aumento. Liu *et al.* (2010) descreveu a indução de stress oxidativo pelo TiO₂ em células PC12 e Trouiller *et al.* (2009) demonstrou a indução de reações inflamatórias e lesões oxidativas em ratinhos expostos a TiO₂ (anatase-rutilo). Após exposição a MWCNTs, alguns autores descrevem o aumento de ROS intracelular em A549 (Srivastava *et al.*, 2013; Ye *et al.*, 2009). No entanto, outros estudos não observaram indução de ROS (Karlsson *et al.*, 2008; Tabet *et al.*, 2009) enquanto em outros foi descrita a indução de quebras de cadeia dupla no DNA por TiO₂ sem a intervenção de espécies reativas de oxigénio (Toyooka *et al.*, 2012).

Como consequência do aumento de ROS intracelular, poderão ocorrer lesões no DNA como por exemplo oxidação das bases do DNA (oxidação) ou quebras de cadeia simples ou dupla. De facto, muitas destas lesões foram detectadas após a exposição a NMs (revistas em Magdolenova *et al.*, 2013).

Recorrendo à versão modificada do ensaio do cometa, com a aplicação de endonucleases de reparação específicas para lesões oxidativas no DNA, é possível determinar o nível de bases (purinas/pirimidinas) oxidadas. Assim, esse estudo foi feito nas células BEAS-2B e A549 expostas aos NMs, com a enzima formamido-aminopirimidinaglicosilase, FPG, que possibilita a deteção de purinas de anel aberto, 8-oxoguanina e formamido-pirimidinas (Collins, 2008; Johansson *et al.*, 2010). Foram analisados quatro NMs: NM-102, NM-402, NM-403 e ainda o NM-110, em células BEAS-2B expostas por 24h ou em células A549 expostas por 3h e 24h. Aparentemente nenhum dos NMs causou um aumento de lesões oxidativas nestas condições experimentais. Este resultado foi inesperado considerando que a maior parte da literatura documenta a indução de ROS e de lesões oxidativas como consequência da exposição aos NMs (revisto em Magdolenova *et al.*, 2013).

Considerando as duas vias possíveis de formação de lesões oxidativas pelos NMs acima mencionadas, i.e., via indirecta ou via secundária, podem ser propostas duas hipóteses que justificam estes resultados: i) os NMs analisados não produziram ROS nas condições experimentais do presente estudo ou ii) os NMs produziram ROS mas não causaram lesões detetáveis pelo ensaio do cometa modificado com FPG.

Embora a maioria dos estudos associe a produção de ROS como o mecanismo mais relevante da genotoxicidade induzida pelos NMs, outros autores tinham já observado a indução de quebras de cadeia dupla no DNA por NMs de TiO₂ sem a intervenção de espécies reativas de oxigénio (Toyooka *et al.*, 2012), o que apoia a hipótese i). Ainda assim, não podemos rejeitar a possibilidade de que as concentrações utilizadas não tenham sido suficientemente elevadas para a produção de ROS. Efetivamente, Huang *et al.* demonstrou a formação de ROS em culturas de fibroblastos, após exposição de longo termo a TiO₂, conduzindo a instabilidade cromossómica (Huang *et al.* 2009). No caso da alternativa ii), é possível que o período de tempo fosse insuficiente para que os ROS formados levassem à lesão do DNA. Ainda se poderia equacionar a possibilidade de que o “uptake” dos NMs pelas células fosse insuficiente. No entanto, a verificação de um efeito genotóxico nas células expostas a NM-102, independente da presença ou ausência de FPG, não apoia esta possibilidade. No entanto, como foi sugerido, tal efeito genotóxico aparenta ser antes um resultado da interferência do NM na deteção dos cometas.

Uma vez que no ensaio do cometa, com ou sem FPG, não se verificou nenhum efeito no NM-402 ou NM-403, não há qualquer evidência de uma ação directa, indirecta ou secundária dos NMs sobre o genoma das células, nas condições experimentais utilizadas.

8.3.6. Análise global dos ensaios *in vitro*

A análise global dos resultados da genotoxicidade *in vitro* resumidos na Tabela 33 permite-nos realizar três inferências, considerando o contexto do estudo desenvolvido:

- i) A avaliação da genotoxicidade de um mesmo NM utilizando dois ensaios distintos de genotoxicidade, na mesma linha celular, pode gerar resultados diferentes;
- ii) A avaliação da genotoxicidade de um mesmo NM utilizando o mesmo ensaio mas em tipos celulares diferentes pode produzir efeitos diferentes;
- iii) Nas mesmas células e utilizando o mesmo ensaio, NMs da mesma classe, portanto com grandes semelhanças na sua constituição química, têm efeitos genotóxicos distintos.

O ponto i) foi verificado ao aplicar ensaio do micronúcleo e o ensaio do cometa em células A549 ou em células BEAS-2B expostas a NM-102. Neste caso, poderá não se tratar de uma verdadeira contradição. De facto, como foi anteriormente discutido, a presença dos NMs sobre os nucleóides causou alguma interferência com a metodologia, pelo que o resultado positivo do ensaio do cometa não deve ser muito valorizado. Porém, no caso do NM-402, positivo no ensaio do micronúcleo e negativo no ensaio do cometa, esta interferência não foi registada. Anteriormente já tinham sido descritas por outros autores discordâncias no resultado do ensaio do micronúcleo e do cometa (Valentin-Severin *et al.*, 2003; Hartmann *et al.*, 2001). Tratando-se de dois ensaios reconhecidamente sensíveis e específicos, as diferenças no resultado devem refletir a diferença entre o tipo de lesões no DNA que cada um detecta: o ensaio do micronúcleo detecta lesões irreparáveis que se manifestam como perda total ou parcial de cromossomas, enquanto o ensaio do cometa detecta lesões primárias que podem ser reparadas. Por sua vez, o procedimento utilizado para o ensaio do cometa não permite a deteção de ligações cruzadas (“crosslinks”) DNA-DNA ou DNA-proteínas, que retardam a migração do DNA e se este for o modo de ação dos NMs, possivelmente passaria despercebido. Alternativamente, se os NMs fossem

unicamente aneugénicos (embora existam poucos agentes químicos nessas condições) e não clastogénicos, os resultados negativos do ensaio do cometa seriam expectáveis, uma vez que não detecta aneuploidia (Hartmann *et al.*, 2001). Esta última possibilidade poderá ser averiguada no futuro recorrendo a hibridação fluorescente *in situ* (FISH) para averiguar qual a origem dos micronúcleos observados (Hartmann *et al.*, 2001).

Por sua vez, a genotoxicidade distinta para o mesmo NM em linhas celulares diferentes, referida em ii), como é o caso dos linfócitos ou células A549 expostas ao NM-403, foi anteriormente descrita por outros autores. Por exemplo, as células BEAS-2B e A549 responderam diferentemente a TiO_2 no que respeita à secreção de fatores pró-inflamatórios, embora a indução de ROS e viabilidade celular fossem semelhantes entre os dois tipos celulares (Ekstrand-Hammarstrom *et al.*, 2012). As células MeT-5A mostraram ser mais sensíveis a danos no DNA induzidos pelos MWCNTs do que as células BEAS-2B, verificando-se diferenças na capacidade dos NMs serem internalizados em cada um dos tipos celulares (Lindberg *et al.*, 2013). Esta observação de uma especificidade de acordo com o tipo celular demonstra a necessidade de se determinarem os efeitos no órgão alvo, havendo necessidade de conhecer mais detalhadamente as vias possíveis de exposição e bioacumulação dos NMs, remetendo-nos para a importância de melhor caracterizar as situações de exposição humana e a toxicocinética daí decorrente.

Relativamente ao ponto iii) vários autores têm sugerido que, na avaliação dos efeitos toxicológicos dos NMs, deverá ser utilizada uma métrica alternativa à dose em massa (Oberdörster; Oberdörster; Oberdörster, 2007; van Hoecke *et al.*, 2009). Como referem Hull *et al.* (2012), a base da utilização da concentração em massa é o pressuposto que a massa molar de um soluto é equivalente a 6.022×10^{23} “partículas” por mole, e este pressuposto não se verifica na escala nano, pois para uma dada massa, a diminuição exponencial da dimensão das partículas aumenta o seu número e a área superficial disponível para interagir com os receptores biológicos (Hull *et al.*, 2012). Deste modo, influencia acontecimentos como a entrada dos NMs nas células e indução de inflamação, podendo, consequentemente, determinar a genotoxicidade diferencial dos NMs. Assim, a aplicação de uma dosimetria baseada apenas na massa pode ocultar informação relevante para a toxicidade dos NMs. Nesse sentido, foi aplicado este tipo de abordagem em cada grupo de NMs estudado nos linfócitos humanos. Recorrendo à informação da área superficial de cada NM, as concentrações a que os linfócitos foram expostos foram convertidas em concentração por área

superficial (Tabela em apêndice). Utilizando esta métrica para os resultados obtidos no ensaio do micronúcleo em linfócitos, as curvas dose-resposta puderam assim ser comparadas (Figura 61).

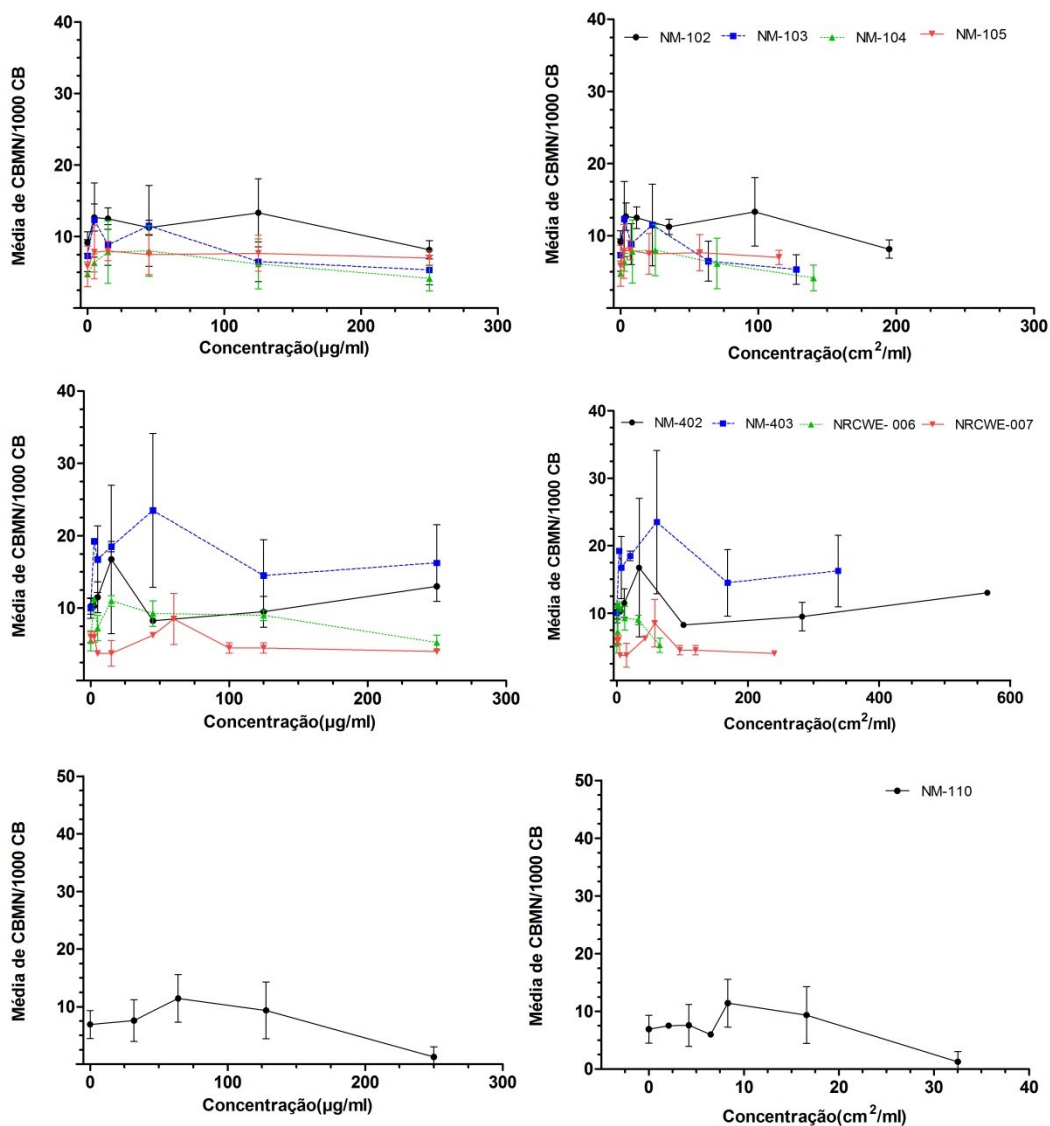


Figura 61. Comparação do resultado do ensaio do micronúcleo utilizando uma métrica baseada na massa ($\mu\text{g/ml}$) ou na área superficial de cada NM (cm^2/ml).

Como mostra a Figura 61, as diferenças que se verificavam na resposta aos NMs de cada tipo não são atenuadas pela modificação da métrica de massa para área superficial, contrariamente ao observado no trabalho de van Hoeck *et al.*, 2009. Isto significa que a área superficial não é o fator determinante da indução de micronúcleos

nos linfócitos, nem para os TiO₂, nem para os NTCs estudados. O mesmo sucede relativamente ao ZnO.

Assim, para os NMs estudados, outras características como o número de partículas, a sua dimensão, tipo de estrutura cristalina ou reactividade de superfície poderão ser mais importantes na determinação da sua genotoxicidade. Tal conclusão é concordante com as observações de Ekstrand-Hammarström *et al.* (2011) em células A549 e BEAS-2B expostas a um conjunto de NMs de TiO₂. Para além disso, este tipo de métrica baseada na área superficial pode também ser mais relevante no caso de medição de outro tipo de parâmetros como por exemplo mutações.

Existem, portanto, cada vez mais evidências de que as semelhanças, e.g., nas dimensões e razão superfície/massa, dentro de um grupo de NMs não significam necessariamente que tais NMs são igualmente genotóxicos. Na perspetiva da avaliação da segurança, a genotoxicidade distinta observada para NMs muito parecidos (e.g. NM-403 e NRCWE-007 em linfócitos) acentua a necessidade e investigar o potencial tóxico de cada NM individualmente, em vez de generalizar um mecanismo comum para um conjunto de NMs semelhantes.

Numa leitura global, os resultados obtidos incrementam a linha de evidência da existência de efeitos genotóxicos de algumas formas de TiO₂ e MWCNT em células humanas *in vitro*. No entanto, os efeitos genotóxicos observados foram em níveis muito reduzidos, sem efeito dose-resposta claro, sendo tais efeitos facilmente afetados pelo sistema experimental utilizado. A variabilidade experimental pode ocorrer entre experiências, e.g., na dispersão dos NMs, na dimensão dos aglomerados na cultura celular, na sedimentação destes sobre as células e portanto influenciar a entrada dos NMs na célula (*uptake*) e a dose intracelular. Dado que presentemente não existe consenso nos protocolos experimentais a serem utilizados para os NMs e nenhum ensaio de genotoxicidade foi ainda validado para esse fim, torna-se fundamental investir na padronização de metodologias de modo a permitir comparabilidade e meta-análises dos dados da literatura, conduzindo a uma melhor compreensão da genotoxicidade dos NMs.

Por tudo o que foi referido, conclui-se que, embora seja possível utilizar as metodologias atuais de avaliação de genotoxicidade *in vitro* preconizadas pelas orientações internacionais para a avaliação da genotoxicidade dos NMs, os resultados devem ser interpretados com cautela, especialmente quando envolvem determinações realizadas de forma automática como no ensaio do cometa. Para além desse aspeto,

em algumas situações, a utilização de concentrações elevadas de NM poderão inviabilizar a obtenção de um resultado devido a interferência no método.

São ainda necessários mais estudos sobre os mecanismos subjacentes à interação nano-bio, para melhor interpretar as diferenças observadas entre tipos celulares, ensaios ou mesmo entre NMs distintos.

8.4. Genotoxicidade dos nanomateriais *in vivo*

8.4.1. Lesões genéticas induzidas pelos NMs *in vivo*

Na sequência dos resultados pouco conclusivos obtidos para o TiO₂ na forma anatase, NM-102, procurou investigar-se o potencial genotóxico deste NM num modelo *in vivo*. Optou-se por recorrer a um desenho experimental integrado, combinando a análise de vários parâmetros em vários órgãos de ratinhos expostos a administração repetida de NM-102 por via intravenosa, incluindo anomalias cromossómicas estruturais e numéricas através do ensaio do micronúcleo em eritrócitos de sangue periférico, quebras da cadeia de DNA detectadas pelo ensaio do cometa em células do baço e do fígado e ainda mutações no gene *LacZ* em células do baço e do fígado. O período de expressão utilizado para os ensaios do micronúcleo (42h) e de mutação (28 dias) baseou-se nas recomendações da literatura para os respetivos ensaios, tendo em consideração o período de duplicação das células dos órgãos-alvo para que ocorresse a fixação das lesões genéticas (OECD, 1997; 2010). No que respeita ao ensaio do cometa, ainda que os 28 dias de expressão excedam as recomendações usuais (EFSA, 2012) foi demonstrado que as lesões no DNA ainda eram detetáveis no fígado após este período de tempo, como foi o caso do controlo positivo. Incluíram-se ainda no desenho experimental análises histológicas e citológicas em amostras do fígado para confirmar a exposição deste órgão e a persistência do TiO₂ neste órgão, 28 dias após a exposição. Nas amostras do fígado foram ainda pesquisadas as respostas tecidulares, e.g. inflamação, que poderiam contribuir para eventual genotoxicidade secundária.

A via de administração intravenosa foi escolhida com a intenção de produzir um cenário de biodisponibilidade completa e exposição sistémica em todos os órgãos dos ratinhos (Fabian et al., 2008), e também com base na toxicocinética descrita para o

NM-102 (NANOGENOTOX Joint Action, 2013). Tem sido referido por vários autores que é fundamental, em qualquer ensaio de genotoxicidade *in vivo*, provar a exposição do órgão-alvo aos NMs através da via de administração utilizada, por forma a garantir a relevância do resultado obtido. Também no estudo presente esse aspeto foi considerado. Por um lado, a informação sobre a toxicocinética dos mesmos NMs em ratos, gerada por outros participantes na Ação Concertada NANOGENOTOX foi utilizada como ferramenta na decisão sobre a via de administração a utilizar e os órgãos-alvo a analisar. Os estudos de toxicocinética após injeção i.v. demonstraram que o fígado era o órgão onde cerca de 98% dos NMs de TiO₂ administrados se acumulavam, sendo cerca de 1% retido no baço e pulmões, enquanto nos restantes órgãos (cérebro, rim, timo, órgãos reprodutores) a acumulação era inferior a 0,1% da dose administrada (NANOGENOTOX, 2013). Os NMs eram rapidamente eliminados do sangue, sendo a acumulação de NMs na medula óssea muito reduzida. Em particular, relativamente ao NM-102, verificou-se a sua acumulação no fígado e baço após administração i.v. de cerca de 10 mg/kg em 1 ou 5 dias consecutivos (NANOGENOTOX, 2013). Este NM ainda persistia nestes órgãos 90 dias após o tratamento. Esta biodistribuição é concordante com a descrita na literatura para outros NMs de TiO₂ em ratos ou ratinhos (Fabian *et al.*, 2008, Xie *et al.*, 2011; Umbreit *et al.*, 2012).

De modo a verificar que, no modelo de ratinhos e nas condições de exposição utilizadas no estudo presente, os NMs atingiam os órgãos alvo, foi efetuada a análise histopatológica e citológica de amostras do fígado nos animais em estudo. A análise histopatológica (realizada por Pedro Costa) revelou que efetivamente os NMs atingiam o fígado e persistiam neste órgão pelo menos até 28 dias após exposição.

Confirmada a exposição do fígado e, sendo provável a exposição do baço, estes dois órgãos foram utilizados para a análise de mutações no transgene *LacZ*. A investigação da genotoxicidade revelou resultados negativos para os três ensaios, e nas células dos três órgãos analisados (sangue, fígado e baço).

Os resultados do ensaio do micronúcleo em reticulócitos de sangue periférico dos ratinhos não mostraram danos cromossómicos, 42h após a segunda administração intravenosa (i.v.) de 10 ou de 15 mg/kg/dia de NM-102. Este resultado é consistente com o descrito por Sadiq *et al.* (2012), em ratinhos B6C3F1, expostos i.v. a 0.5, 5.0, ou 50 mg/kg/dia de TiO₂ (anatase, 12.1 nm de diâmetro) por 3 dias consecutivos. Estes autores demonstraram que, apesar da acumulação de TiO₂ atingir o máximo na medula óssea, 4h após i.v. e os níveis serem mantidos por alguns dias, não havia alteração da frequência de RETs micronucleados no dia 4 após a exposição

(Sadiq *et al.*, 2012). Outros autores demonstraram que o TiO₂ anatase não causava efeitos citogenéticos (micronúcleos, protusões, núcleos atípicos) na medula óssea, duodeno e células epiteliais do cólon de ratinhos CBAB6F1 expostos por via oral (por sonda esofágica) a 40, 200 ou 1000 mg/kg por 7 dias (Shycheva *et al.*, 2011). Igualmente, em ratinhos C57BL/6J expostos por inalação durante 5 dias a uma mistura de TiO₂ (74% anatase, 26% broquite), não foram observadas alterações na frequência de RETs micronucleados (Lindberg *et al.*, 2012). Porém, a administração oral de TiO₂ (75% anatase e 25% rutilo), através da água induziu danos cromossômicos na dose de 500 mg/kg, mas não em doses inferiores (Trouiller *et al.*, 2009). Também Shelby *et al.* observaram a indução de micronúcleos em células do sangue e da medula óssea *in vivo*, após injeção intraperitoneal de 1000 mg/kg de TiO₂ (Shelby *et al.*, 1993 *cit. in* Shycheva *et al.*, 2012).

No presente trabalho, decorridos 28 dias após a última administração, não eram detetáveis quebras de cadeia simples ou dupla de DNA no fígado nem no baço dos ratinhos expostos a 10 ou 15 mg/kg de NM-102, em dois dias consecutivos. Considerando que o ensaio do cometa deteta essencialmente lesões primárias e transitórias no DNA, pode ser colocada a hipótese de que o tempo de exposição de 28 dias seria demasiado longo para utilizar neste ensaio. No entanto, os resultados negativos são compatíveis com a ausência de efeitos mutagénicos nos mesmos órgãos, determinada no ensaio de mutações em *LacZ*. Para além disso, a persistência do TiO₂ nas células do fígado sugere que um efeito lesivo local ainda poderia estar a ocorrer 28 dias após a injeção. Tal efeito foi observado para o controlo positivo (ENU), que induziu lesões no DNA em níveis muito significativos 28 dias após exposição.

Na realidade, os resultados negativos no ensaio do cometa estão em concordância com os observados em células do pulmão de ratos expostos por instilação a um TiO₂ anatase (5 nm of diametro, área superficial de 316 m²/g) em doses de 1.0 ou 5.0 mg/kg ou 0.2 or 1.0 mg/kg 1 vez por semana, durante 5 semanas (Naya *et al.*, 2012). Também é consistente com os resultados em células do fluido bronco- alveolar de ratos Wistar expostos por inalação à forma rutilo de TiO₂ (Landsiedel *et al.*, 2010). Contrariamente, foi observado um aumento nas lesões de DNA em células mononucleares de sangue periférico de ratinhos C57BL/6 expostos intratraquealmente a 20 mg/kg TiO₂ (<100 nm, forma cristalina não especificada; Hwang *et al.*, 2010) e em células da medula óssea e fígado de ratinhos CBAB6F1 expostos oralmente a 40, 200 ou 1000 mg/kg bw de TiO₂ anatase com diâmetro 33,2 nm e modificada com simeticone (Shycheva *et al.*, 2011).

Finalmente, no presente estudo verificou-se a ausência de efeitos mutagénicos no fígado e baço, em concordância com o estudo da literatura em sangue periférico de ratinhos B6C3F1 expostos a TiO₂ anatase, na mesma gama de doses, mostrando ausência de efeitos mutagénicos no ensaio de mutações do gene *Pig-a* (Sadiq *et al.*, 2012). Por sua vez, o trabalho de Driscoll *et al.*, também descreveu resultados negativos relativamente à indução de mutações no gene *hprt* em células alveolares de tipo II, de ratos expostos a duas instilações intratraqueais de 5 mg/kg anatase TiO₂, em dias consecutivos, tendo no entanto descrito um aumento de mutações após uma dose de 2 x 50 mg/kg (Driscoll *et al.*, 1997). Porém, nesse estudo o TiO₂ apresentava um diâmetro médio de 180 nm, muito superior ao do NM-102 do estudo presente, que era entre 20 e 33 nm. Um efeito mutagénico foi também descrito em ratos expostos durante a gestação através da água que as mães ingeriam, numa dose de 500 mg/kg (Trouiller *et al.*, 2009). Porém, o NM utilizado pelo grupo de Trouiller consistia numa mistura de 75% anatase e 25% rutilo, pelo que não pode ser diretamente comparado ao estudo presente.

Globalmente, assumindo que o fígado foi efetivamente exposto a NM-102, o que é fundamentado na análise histológica e citológica, é possível que o NM-102 simplesmente não seja genotóxico no sangue, no fígado e no baço. Esta possibilidade é apoiada pela maioria dos ensaios de genotoxicidade que indicam resultados negativos após exposição a TiO₂ (enunciados na Tabela 14), apesar de alguns efeitos genotóxicos terem também sido descritos anteriormente na literatura (Tabela 15). Existem muitas diferenças nesses estudos, principalmente em relação às características do TiO₂ utilizado, vias de administração, doses, etc., que podem explicar as diferentes conclusões obtidas. Se considerarmos apenas os estudos onde se administrou *in vivo* a forma anatase de TiO₂, verificamos que entre os sete estudos citados (Driscoll *et al.*, 1997; Naya *et al.*, 2012; Shycheva *et al.*, 2011; Sadiq *et al.*, 2012) apenas dois geraram resultados positivos. Correspondem ao ensaio do cometa na medula óssea e fígado de ratinhos expostos oralmente a doses elevadas de TiO₂ (Shycheva *et al.*, 2011) e um ensaio de mutação em células de pulmão de ratos expostos intratraquealmente a 2 x 50 mg/kg (Driscoll *et al.*, 1997). Todavia, os resultados do único estudo em que se pode assumir 100% de biodisponibilidade, devido à utilização da via de administração i.v. (Sadiq *et al.*, 2012), são coerentes com os do estudo presente. Para além disso, o estudo de Sadiq *et al.* recorreu à utilização de um NM de pequeno diâmetro, sem modificações de superfície, à semelhança do NM-102, enquanto o resultado positivo de Driscoll *et al.* (1997) foi obtido com um TiO₂

de diâmetro superior, o que sugere que a relação das características dos NMs em estudo com a sua genotoxicidade ainda terá de ser mais investigada.

A comparação detalhada dos presentes resultados com os descritos na literatura mostra que mesmo para metodologias bem validadas *in vivo*, como o ensaio do micronúcleo, podem obter-se resultados diferentes quando se utilizam TiO₂ distintos, que diferem ligeiramente uns dos outros em alguma característica físico-química (Lindberg *et al.*, 2012; Sadiq *et al.*, 2012; Sycheva *et al.*, 2011; Trouiller *et al.*, 2009; Shelby *et al.*, 199). Esta constatação evidencia a importância de investigar o potencial tóxico de cada NM específico, em vez de considerar perfis toxicológicos idênticos para NMs da mesma classe, uma vez que as características físico-químicas revelam-se determinantes da sua genotoxicidade.

Os resultados negativos obtidos no presente estudo não excluem a hipótese geralmente aceite de um mecanismo secundário de genotoxicidade *in vivo*, envolvendo inflamação e produção de ROS que conduz a lesões no DNA após exposição aos NMs. Se este for o caso, seria necessária uma exposição prolongada a NMs para produzir um efeito genotóxico detectável. Efetivamente, a análise histopatológica (discutida na secção seguinte) apenas revelou uma inflamação moderada no fígado dos animais expostos à dose mais elevada, podendo significar uma resposta inicial que mais tarde viria a conduzir a genotoxicidade.

A integração destes ensaios, consistindo essencialmente na soma dos resultados dos elementos constituintes, em geral contribui para uma leitura final com maior significado. Ao introduzir-se uma abordagem integrada (Krishna *et al.*, 1998) em que foram analisados, em cada ratinho, vários parâmetros de genotoxicidade, assume-se que o resultado negativo obtido tem maior consistência e aumenta a evidência, ou “weight of evidence”, da ausência de efeitos genotóxicos do TiO₂ *in vivo*. No entanto, considerando a biopersistência do NM no fígado, bem como a inflamação moderada verificada, existe a possibilidade da ocorrência de lesões secundárias, que ainda deverá ser investigada.

8.4.2. Bioacumulação dos nanomateriais *in vivo*

Considerando a ausência de efeitos genotóxicos, no sentido de confirmar a exposição do órgão alvo ao NM-102, e também para pesquisar a existência de alterações histopatológicas nos tecidos dos ratinhos expostos *in vivo*, procedeu-se neste trabalho ao exame microscópico de cortes do fígado. Foi confirmada a presença de NMs nas células do fígado dos ratinhos, 28 dias após a exposição. O depósito de NMs era observável quer por microscopia óptica, quer por microscopia electrónica de transmissão. Os NMs foram localizados na forma dispersa ou aglomerados entre ou no interior dos hepatócitos, sendo mesmo visíveis no interior de alguns núcleos, sugerindo a possibilidade de uma ação directa do NM-102 sobre o DNA. Estudos *in vivo* sugerem que o dióxido de titânio é capaz de se inserir também nas bases de DNA, ligando-se aos nucleótidos e alterando a estrutura secundária do DNA (Li *et al.*, 2010). Este tipo de mecanismo justificaria a ausência de lesões oxidativas medidas através do ensaio do cometa modificado com FPG *in vitro*, discutidos anteriormente.

Relativamente aos efeitos tóxicos observáveis nas secções histológicas, estes correspondem a um efeito inflamatório moderado observado nos animais expostos à dose mais elevada. Esta observação concorda com os efeitos hepatotóxicos moderados do TiO₂, descritos em vários organismos, desde peixes (Federici *et al.*, 2007) a ratinhos (Saber *et al.*, 2012; Fabian *et al.*, 2008). Em particular, a acumulação de NMs nas células de Kupffer demonstra uma tentativa de eliminação através de fagocitose pelos macrófagos do fígado, que já foi descrita por outros autores (Bruno *et al.*, 2013; Olmedo *et al.*, 2008). Efetivamente, o papel das células de Kupffer na remoção dos NMs do organismo já foi igualmente demonstrado (Sadauskas *et al.*, 2007).

Assim, os estudos histológicos e citológicos demonstram a bioacumulação de NM-102 no fígado de ratinhos expostos por via i.v. e o efeito inflamatório moderado neste órgão deverá ser futuramente estudado para averiguar a possibilidade de ocorrência de genotoxicidade secundária num período de tempo mais longo após a exposição.

8.5. Comparação entre os resultados *in vitro* e *in vivo*

A utilização de um conjunto de ensaios *in vitro* e *in vivo* é uma abordagem recomendada nas orientações internacionais para a avaliação da genotoxicidade dos compostos químicos (ICH; EMEA, 1996; 1998; Eastmond *et al.*, 2009). Enquanto os ensaios *in vitro* permitem analisar a genotoxicidade em sistemas celulares simples e em condições estritamente controladas, os ensaios *in vivo* incorporam mecanismos de toxicocinética (absorção, distribuição, metabolismo, eliminação) e toxicodinâmica (por exemplo, reparação de lesões no DNA) sendo mais facilmente extrapoláveis para a situação humana.

Perante a necessidade premente de substituir, sempre que possível, a experimentação animal por métodos alternativos, a correlação entre os ensaios *in vitro* e *in vivo* tem sido discutida amplamente na literatura.

Para a análise dos resultados obtidos segundo esta perspectiva, foi elaborada a Tabela 36:

Tabela 36. Comparação dos resultados obtidos nos ensaios de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* após exposição ao NM-102.

	Órgão/tecido de origem	Ensaio	Resultado
	Sangue periférico	Micronúcleo	(+)
<i>In vitro</i>	BEAS-2B	Micronúcleo	-
		Cometa	+
	A549	Micronúcleo	-
		Cometa	+
	Sangue periférico	Micronúcleo	-
<i>In vivo</i>	Fígado	Cometa	-
		Mutação	-
	Baço	Cometa	-
		Mutação	-

“+”: Positivo aumento estatisticamente significativo em pelo menos duas concentrações ou um aumento estatisticamente significativo na dose alta e uma relação dose-resposta; “(+)”: Equívoco aumento estatisticamente significativo em uma concentração, sem relação dose-resposta; “-” Negativo.

Assim, como foi já discutido, para o NM-102 os resultados *in vitro* positivos não se confirmaram *in vivo*, nas condições estudadas. Esta situação verifica-se mesmo quando analisamos células sanguíneas *in vitro* (linfócitos) ou *in vivo* (eritrócitos e esplenócitos). Porém, isto não significa que os ensaios *in vitro* não tenham valor, uma vez que várias diferenças poderão explicar os diferentes resultados, como sendo as doses utilizadas. Han *et al.* propõem uma alteração na métrica utilizada para possibilitar a correlação *in vitro-in vivo* (Han *et al.*, 2012). Na sua análise, a utilização da área superficial em vez da massa permitiu observar uma correlação entre os resultados observados *in vitro* e *in vivo*. Porém, como foi discutido no contexto dos ensaios *in vitro*, a alteração de tal métrica não aparenta ser determinante para os resultados obtidos para o NM-102, o que apoia alguns autores que sugerem que com base no conhecimento atual a toxicidade dos NMs não precisa ser analisada de modo distinto da dos compostos químicos convencionais (Maurer-Jones; Haynes, 2012).

9. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

9.1. Necessidades sociais sobre Nanomateriais Manufaturados

O incremento significativo no desenvolvimento de nanomateriais manufaturados a nível mundial surge como um fator-chave de inovação em termos de aplicações e produtos, especialmente promissor na área da medicina. No entanto, embora vários estudos *in vitro* e *in vivo* indiciem alguns efeitos biológicos adversos dos NMs com potencial impacto na saúde humana, a informação sobre os níveis de NMs a que a população humana se encontra exposta em contexto ocupacional ou ambiental é escassa. Por este motivo, as necessidades “sociais” previstas para o futuro dos nanomateriais manufaturados relacionam-se, por um lado com o desenvolvimento de novas aplicações e, por outro lado, com o desenvolvimento de um paradigma de nanotoxicologia preditiva que permita evitar os seus potenciais efeitos adversos durante todo o seu ciclo de vida (Roco *et al.*, 2010) garantindo a sua utilização segura (Figura 62).



Figura 62. Enquadramento da nanotoxicologia nas necessidades “sociais” atuais para garantia da saúde pública (Louro *et al.*, 2013b).

Para isso é fundamental a realização de uma avaliação de risco ao longo do ciclo de vida dos NMs, desde a sua síntese e produção até à sua eliminação, com a ponderação dos riscos colocados a todos os intervenientes em contexto ocupacional, ambiental ou de consumidor/utilizador. Por outro lado, importa prosseguir os estudos laboratoriais no sentido de caracterizar a eventual toxicidade desses NMs. Os estudos de genotoxicidade poderão fornecer evidências quanto ao potencial de os NMs contribuírem para o desenvolvimento de doenças crónico-degenerativas e genéticas e, em particular, de cancro. Neste contexto, o presente estudo de nanotoxicologia constitui um contributo relativamente à avaliação dos efeitos nocivos dos NMs e suas implicações no desenvolvimento de doenças crónico-degenerativas e genéticas e, em particular, de cancro.

Esta plataforma de evidência permitirá abordar de forma científica este desafio que surge para a Saúde Pública: permitir a inovação minimizando o seu impacto na saúde pública, possibilitando uma abordagem *safe-by-design*, através da produção de NMs com efeitos adversos reduzidos, que facilite o progresso tecnológico e “societal” que a aplicação dos novos nanomateriais prenuncia.

9.2. Conclusões do presente estudo

O presente trabalho, enquadrado na área da Nanotoxicologia, procurou contribuir para colmatar algumas das necessidades “societais” enunciadas, deste modo procurando salvaguardar a Saúde Pública. Foi desenvolvido na perspectiva integrada da Saúde Ambiental e Ocupacional e foram cumpridos os seguintes objectivos:

- Avaliação da genotoxicidade de NMs em três tipos de células humanas expostas *in vitro*: linfócitos humanos, linha celular de epitélio brônquico humano (BEAS-2B) e linha celular de adenocarcinoma epitelial de pulmão humano (A549).
- Avaliação da genotoxicidade de um NM de TiO_2 num modelo de ratinho transgénico.
- Investigação de alguns mecanismos de ação que poderão contribuir para a genotoxicidade dos nanomateriais.

Com respeito às hipóteses de trabalho inicialmente enunciadas, várias considerações podem ser tecidas.

A hipótese H1 preconizava que os NMs produzem efeitos genotóxicos em células humanas (*in vitro*), que se traduzem numa curva dose- resposta. Esta hipótese não se comprovou para a generalidade dos NMs. Os nanomateriais de dióxido de titânio, NM-103 e NM-104, bem como os nanotubos de carbono de parede múltipla, NM-403 e NRCWE-006, revelaram propriedades genotóxicas pouco acentuadas em linfócitos humanos, embora nas células do trato respiratório não se verificassem tais efeitos no caso do NM-403. Por seu lado, o nanotubo NM-402, equivocadamente genotóxico em linfócitos, mostrou-se claramente genotóxico em células do epitélio pulmonar. Assim, embora alguns NMs tenham causado efeitos genotóxicos moderados em algumas concentrações, apenas no caso do NM-402 foi identificado um efeito dose-resposta após exposição de células de pulmão.

Verificaram-se grandes diferenças na genotoxicidade de NMs, da mesma classe, quando analisados no mesmo sistema celular (e.g. NM-102 vs NM-105 ou NM-402 vs NM-403) que podem refletir a influência de diferentes propriedades físico-químicas, aspeto que deve ser considerado ao efetuarem-se generalizações em contexto de análise de risco, uma vez que as diferenças observadas nos resultados de genotoxicidade em cada grupo de NMs não são negligenciáveis. Esta constatação vem ao encontro da conclusão da Ação Concertada NANOGENOTOX, obtida perante

um conjunto de dados mais alargado que os apresentados no presente trabalho (NANOGENOTOX Joint Action, 2013).

Os efeitos genotóxicos detetados em células humanas, como por exemplo, a frequência de micronúcleos, observaram-se a níveis reduzidos, ainda que superiores aos controlos negativos, e a sua reprodutibilidade foi dependente do sistema experimental utilizado. Efetivamente, ao aplicar para os NMs as metodologias atuais de avaliação de genotoxicidade *in vitro* preconizadas pelas orientações internacionais, diversas dificuldades experimentais surgiram na sua execução, que foram expressas nas secções anteriores.

Neste trabalho, as dificuldades inerentes à preparação de NMs para utilização em ensaios biológicos foram ultrapassadas através de uma colaboração multidisciplinar que garantiu a adequada caracterização dos NMs, bem como o estabelecimento de procedimentos experimentais de dispersão dos NMs nos meios de exposição, minimizando a aglomeração. Ainda assim, verificou-se uma elevada variabilidade nas determinações efetuadas nos ensaios de genotoxicidade, patente no elevado desvio padrão, que por vezes impediu a deteção de efeito dose-resposta ou de diferenças estatisticamente significativas. Por estes motivos, a evidência de genotoxicidade para alguns NMs revelou-se equívoca, conduzindo à necessidade de esclarecimento através de ensaios *in vivo*.

Subsequentemente, foi analisada a hipótese H2, segundo a qual um NM, o NM-102, produz efeitos genotóxicos em organismos (*in vivo*), que se correlacionam com os efeitos observados fracamente positivos observados em linfócitos humanos *in vitro*. Para esse fim, recorreu-se a uma análise integrada de múltiplos parâmetros num modelo animal, o ratinho transgénico baseado em plasmídeo contendo o gene *LacZ*. Embora tenha sido demonstrada a exposição e acumulação do NM-102 no fígado, não se observaram efeitos genotóxicos no fígado, no baço ou no sangue dos ratinhos expostos a duas doses de NMs, sendo a hipótese H2 rejeitada. Apesar do esforço em reduzir a experimentação animal, esta revelou-se como indispensável para esclarecer resultados equívocos *in vitro*, sendo mais facilmente extrapolável para a situação humana.

Foi factor facilitador para o desenho deste ensaio *in vivo* a informação obtida por parceiros da Ação Concertada, que haviam estudado previamente a toxicocinética e a biopersistência do NM-102 em órgãos de ratos expostos por via intravenosa a este NM (NANOGENOTOX, 2013). Por sua vez, o conhecimento de que a administração de NM-102 por via oral e instilação produzia efeitos genotóxicos no baço e medula

óssea (Valerie Fessard, comunicação pessoal) fundamentou a seleção da dose a analisar. Com base nestes trabalhos *in vivo*, utilizando o mesmo NM e preparado do mesmo modo, foi possível limitar o grupo de tratamentos a realizar, bem como as restantes variáveis experimentais (administração, dose, tempo de expressão) sendo possível restringir o número de animais utilizados.

Numa abordagem aos mecanismos de genotoxicidade, a hipótese H3 sugeria que a exposição das linhas celulares aos NMs conduz à produção de espécies reativas de oxigénio, e estas contribuiriam para a genotoxicidade verificada em alguns casos. A averiguação de H3 baseou-se no ensaio do cometa modificado e através desta metodologia não se verificou a contribuição das lesões oxidativas para a genotoxicidade dos NMs. No entanto, para se concluir mais rigorosamente sobre a produção de espécies reativas de oxigénio, será necessário no futuro utilizar indicadores mais directos, como a quantificação de ROS.

A análise citológica permitiu analisar a hipótese H4, segundo a qual após exposição *in vivo*, os NMs conseguem penetrar nas células e este efeito relaciona-se com a sua genotoxicidade *in vivo*. Tendo sido verificada a deposição dos NMs nas células do fígado de alguns dos ratinhos expostos a NM-102, também verificada através de análise histológica em todos os animais tratados com este NM, não se verificou genotoxicidade nas condições experimentais testadas, pelo que esta hipótese foi rejeitada.

O estudo da citotoxicidade complementarmente à genotoxicidade nos modelos *in vitro* utilizados permitiu aferir em que medida os resultados obtidos nos ensaios de genotoxicidade estavam a ser afetados pela morte celular, mecanismo frequentemente despoletado nas células cujo DNA foi altamente danificado. No caso do ZnO, a sua toxicidade foi transversal aos vários tipos celulares utilizados, possivelmente devido à dissolução dos iões zinco, sendo as concentrações testadas limitadas por esta toxicidade. Relativamente aos restantes NMs, a toxicidade não era tão óbvia e dependia do tipo celular e do ensaio utilizado, tal como o seu potencial genotóxico.

A análise dos resultados globais do projeto demonstrou que é possível utilizar, para os NMs, as metodologias atuais de avaliação de genotoxicidade *in vitro* preconizadas pelas orientações internacionais, como o ensaio do micronúcleo em linfócitos ou em células de mamífero, mas que os resultados devem ser interpretados com prudência, podendo mesmo ser inviáveis para análise de concentrações mais elevadas de alguns NMs devido a interferência nos métodos. Para além disso, no caso particular dos NMs, o valor preditivo destes testes para a situação *in vivo* e para a

carcinogenicidade humana ainda não está completamente validado, sendo necessário prosseguir a investigação.

Por outro lado, conclui-se que não é possível classificar como “monosubstância” os grupos de NMs (TiO_2 , MWCNTs) uma vez que as diferenças observadas nos resultados de genotoxicidade não são negligenciáveis (NANOGENOTOX Joint Action, 2013). Com base nesse pressuposto, a informação sobre o caso do NM-102, que foi mais profundamente analisado neste trabalho, pode ser especificamente ponderado em termos de avaliação de risco, sem efetuar generalizações. Após ensaios em células humanas onde se registou alguma genotoxicidade moderada do NM-102, foi demonstrada a inexistência de propriedades genotóxicas nos ratinhos expostos a este NM, nas condições experimentais analisadas, muito embora fosse comprovada a exposição interna dos órgãos ao NM. Esta caracterização da genotoxicidade do NM-102 deve agora ser complementada com outras linhas de evidência essenciais para a avaliação de risco do NM-102, designadamente no que refere à caracterização da exposição humana (doses, período de tempo de exposição, vias de exposição, etc.). A determinação dos níveis de contaminação ambiental ou ocupacional com estes NMs, bem como o registo de casos de efeitos adversos nos indivíduos expostos também se revela essencial.

Na literatura, a informação disponível sobre estes aspetos, relativamente ao NM-102 em específico, é praticamente inexistente. Os estudos epidemiológicos descritos na Tabela 11 referem apenas a exposição a TiO_2 , sem descrição concreta do NM, preocupando-se essencialmente com a exposição pulmonar ao pó. Ora, sabe-se que o TiO_2 na forma anatase é utilizado frequentemente em cosméticos e tintas, em meio aquoso ou óleo, ou ainda em alimentos, pelo que importa conhecer a exposição do consumidor por estas vias no futuro. Porém, na opinião emitida pelo SCCS (2013) a via dérmica é uma via muito improvável de absorção dos TiO_2 pelas células viáveis, sendo sugerida a ausência de perigo para a saúde decorrente da utilização destes NMs.

No entanto, perante a incerteza dos níveis de exposição real do organismo humano e do ambiente que foi descrito ao longo deste trabalho, a segurança da utilização dos NMs de TiO_2 não pode ser garantida a longo prazo e, tendo em conta a elevada produção e utilização destes NMs, são urgentes estudos de monitorização ambiental e humana.

9.3. Perspetivas Futuras- os Nanomateriais no caminho da Saúde Ambiental e Ocupacional

A complexidade associada às propriedades físico-químicas únicas dos NMs, que variam mesmo entre NMs do mesmo grupo, dificulta a caracterização da genotoxicidade destes materiais, conduzindo a que a comparação dos resultados de diversos estudos constitua um desafio para cientistas e reguladores (Louro; Borges; Silva, 2013). Tal complexidade inerente à nanotoxicologia tem vindo a ser ultrapassada através de uma abordagem alargada e multidisciplinar, envolvendo a integração de resultados de toxicocinética e toxicodinâmica com os da caracterização exaustiva das propriedades físico-químicas dos NMs e do seu comportamento dinâmico em meios biológicos. Essa integração tem progressivamente incrementado os conhecimentos sobre as interações dos NMs com os sistemas biológicos e os mecanismos de ação subjacentes aos efeitos observados, ao nível tecidular, celular e molecular, contribuindo para um reforço da evidência científica sobre a potencial toxicidade dos NMs. No decurso deste trabalho foram respondidas algumas questões mas também foram identificadas algumas lacunas no conhecimento relevantes para a proteção da saúde pública, relativamente à avaliação de risco associado aos NMs, designadamente:

- Existe mais conhecimento sobre o perigo (*hazard*) do que sobre a exposição;
- Não existe uma rastreabilidade ao longo do ciclo de vida dos NMs, desde a sua síntese e produção até à sua eliminação;
- A investigação associada ao contexto ocupacional é muito reduzida e não existem limites de exposição bem definidos para fundamentar as decisões de saúde ocupacional.
- Não existe suficiente conhecimento científico sobre qual, ou quais, as propriedades dos NMs que são determinantes para a sua toxicidade, inviabilizando a síntese dirigida de NMs mais seguros.

Por estes motivos, reconhece-se no presente estudo que a atual base de evidência e conhecimento tem uma aplicação muito reduzida à saúde humana. Tendo em consideração o elevado volume de produção de NMs, o contexto ocupacional é,

em primeira linha, o mais diretamente afetado por uma insuficiente avaliação da segurança dos NMs.

Para ultrapassar esta limitação, propõem-se de seguida concretamente áreas do conhecimento a desenvolver no futuro, especialmente a nível nacional:

- i) Organizar um registo nacional de todas as unidades industriais produtoras e utilizadoras de NMs;
- ii) Implementar um registo nacional de produtos de consumo humano contendo NMs;
- iii) Efetuar o registo de trabalhadores potencialmente expostos a NMs na realização das suas tarefas e, logo que possível, fazer uma estimativa da sua exposição;
- iv) Envolver a Indústria para fornecer informação sobre as abordagens utilizadas para avaliação dos riscos de exposição aguda (acidental) e planos de contingência em caso de acidente bem como os riscos possíveis efeitos da exposição crónica (baixas doses) e as medidas preventivas adoptadas;
- v) Estabelecer uma base de dados de casos clínicos associados a efeitos nefastos de exposição a nanomateriais;
- vi) Monitorizar eventuais efeitos a longo prazo associados à exposição crónica a NMs.
- vii) Partilhar o conhecimento através da construção de bases de dados e de repositórios de informação sobre as metodologias de avaliação de risco, resultados de investigação e medidas de vigilância e estimular a sua disseminação no meio científico e na sociedade.

Alguns destes aspetos encontram-se contemplados num projeto europeu recentemente iniciado, NANoREG (<http://nanoreg.eu/>) em que o INSA se encontra envolvido, ao abrigo do protocolo PToNANO celebrado entre o INSA, Direcção-Geral de Saúde, Instituto Português da Qualidade e Instituto de Soldadura e Qualidade. Este projeto envolve cerca de 60 parceiros europeus, incluindo representantes dos principais intervenientes na área dos NMs (Reguladores, Indústria e Ciência), e tem por objectivo contribuir para a regulação da utilização de NMs em produtos industriais e de consumo humano, baseada na evidência científica.

Enquanto o conhecimento atual não é suficientemente sólido para permitir uma regulação da produção e aplicação das variadas classes de nanomateriais totalmente baseada na evidência científica, a adoção do princípio da precaução pode ajudar em simultâneo a inovação e a ciência. Como foi anteriormente referido, este princípio preconiza a necessidade de agir perante uma situação de incerteza de perigo potencialmente grave ou irreversível para a saúde ou para o ambiente, com o objetivo de o reduzir antes de se vir a provar cabalmente que ele existe de facto, tendo em conta os custos e benefícios da ação e da inação. Este princípio inclui elementos como: i) investigação e monitorização para deteção precoce dos perigos associados aos NMs; ii) redução geral da carga ambiental; iii) promoção de uma produção de NM ecológica e inovadora; iv) princípio da proporcionalidade, onde o custo das ações para prevenir os perigos não deverá ser desproporcionado relativamente aos seus prováveis benefícios. Embora por vezes se tema que uma abordagem precaucionária possa asfixiar a inovação ela pode, na realidade, proporcionar oportunidades de compreensão de sistemas complexos emergentes, tendo em conta as necessidades humanas, com menores custos para a saúde e para o ambiente. Assim, acomodar a avaliação de risco no processo de inovação tecnológica poderá ajudar a ultrapassar a relação controversa entre inovação e regulação.

Para além destes desafios, a construção de repositórios de NMs de referência e a sua partilha entre a comunidade científica afigura-se como essencial para possibilitar a comparação interlaboratorial dos efeitos observados para um mesmo NM ou para uma classe de NMs. No futuro, a investigação laboratorial dos mecanismos de interação nano-bio deverá ser desenvolvida, recorrendo à utilização de metodologias inovadoras, em especial abordagens de elevado rendimento, forte poder preditivo e custo controlado que possibilitem antecipar o risco associado à colocação no mercado de novos NMs que vão sendo desenvolvidos. Significa isto que é necessário implementar métodos de avaliação de uma eventual toxicidade numa fase precoce do desenvolvimento do NM, antes de entrar na fase de produção industrial, para evitar grandes perdas económicas decorrentes de uma descoberta tardia de toxicidade e poder dirigir a síntese no sentido de obter moléculas mais seguras. De facto, a nanotecnologia foi identificada como uma das *key enabling technologies* no Horizon 2020 e, para o seu desenvolvimento sustentado e responsável preconizado por esta agenda estratégica de investigação (Savolainen et al., 2013) deverá recorrer-se aos dados da nanotoxicologia, no sentido de dirigir a síntese de nanomateriais manufaturados que sejam *safe-by-design*, isto é, eliminando as características

responsáveis pela sua toxicidade e possibilitando o progresso tecnológico e “societal” que a aplicação dos novos nanomateriais prenuncia (Figura 62).

A agenda estratégica de investigação em nanosegurança (Savolainen et al., 2013) identifica como necessidades de investigação e prioridades para os próximos dez anos, quatro grandes áreas temáticas: 1) identificação e classificação dos NMs; 2) Exposição e transformação dos NMs; 3) Mecanismos de toxicidade relacionados com efeitos em humanos e no ambiente e 4) ferramentas para análise preditiva e gestão de risco, incluindo bases de dados e ontologias.

Na área da Saúde Pública, é necessário também atuar atempadamente e tomar decisões regulamentares relativamente os NMs que permitam uma governança de risco mais adaptativa e eficaz. Não apenas a avaliação de risco, mas também a gestão do risco e a comunicação do risco, deverão ser reformuladas perante estes novos materiais. É essencial também a partilha de informação fidedigna entre todas as partes envolvidas para uma ação política efectiva e também a participação ativa de todos, incluindo dos cidadãos atentos e informados, nas tomadas de decisão. Acima de tudo, a Saúde Pública terá de assegurar a interligação e o equilíbrio entre a evolução tecnológica e a garantia da segurança dos nanomateriais e das nanotecnologias, por forma que possamos beneficiar da inovação assegurando a proteção do ambiente e da saúde humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, R.J.; CHAUDHRY, M.Q.; BOXALL, A.B.A.; HULL, M.- Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends. **Occupational Medicine**. 56: 6 (2006) 300–306.

ALARIFI, S.; ALI, D.; ALKAHTANI, S.; VERMA, A.; AHAMED, M.; AHMED, M., ALHADLAQ, H.A. - Induction of oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in a malignant human skin melanoma cell line after exposure to zinc oxide nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**. 8 (2013) 983-993.

ANDUJAR, P.; LANONE, S.; BROCHARD, P.; BOCZKOWSKI, J. - Respiratory effects of manufactured nanoparticles. **Revue des Maladies Respiratoires**. 28 (2011) e66-75.

ASAKURA, M.; SASAKI, T.; SUGIYAMA, T.; TAKAYA, M.; KODA, S.; NAGANO, K.; ARITO, H.; FUKUSHIMA, S. - Genotoxicity and cytotoxicity of multi-wall carbon nanotubes in cultured Chinese hamster lung cells in comparison with chrysotile A fibers. **Journal of Occupational Health**. 52 (2010) 155-166.

ASITA, A.O.; HAYASHI, M.; KODAMA, Y.; MATSUOKA, A.; SUZUKI, T.; SOFUNI, T. - Micronucleated reticulocyte induction by ethylating agents in mice. **Mutation Research**. 271(1992) 29-37.

ATSUTA, J.; STERBINSKY, S.A.; PLITT, J.; SCHWIEBERT, L.M.; BOCHNER, B.S.; SCHLEIMER, R.P. - Phenotyping and cytokine regulation of the BEAS-2B human bronchial epithelial cell: demonstration of inducible expression of the adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. 17 (1997) 571-582.

BAI C. - Global voices of science. Ascent of nanoscience in China. **Science**. 309: 5731 (2005 Jul 1) 61-63.

BECKER, H.; HERZBERG, F.; SCHULTE, A.; KOLOSSA-GEHRING, M. - The carcinogenic potential of nanomaterials, their release from products and options for regulating them. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. 214 (2011) 231– 238.

BECKETT, W.S.; CHALUPA, D.F.; PAULY-BROWN, A.; SPEERS, D.M.; STEWART, J.C.; FRAMPTON, M.W.; UTELL, M.J.; HUANG, L.S.; COX, C., ZAREBA, W.; OBERDORSTER, G. - Comparing inhaled ultrafine versus fine zinc oxide particles in healthy adults: a human inhalation study. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 171 (2005) 1129-1135.

BELLO, D.; HART, A.; AHN, K.; HALLOCK, M.; YAMAMOTO, N.; GARCIA, E.; ELLENBECKER, M.; WARDLE, B. - Particle exposure levels during CVD growth and subsequent handling of vertically-aligned carbon nanotube films. **Carbon**. 46 (2008) 974-981.

BELLO, D.; WARDLE, B.; YAMAMOTO, N.; DEVILLORIA, R.G.; GARCIA, E.; HART, A.; AHN, K.; ELLENBECKER, M.; HALLOCK, M. - Exposure to nanoscale particles and fibers during machining of hybrid advanced composites containing carbon nanotubes. **Journal of Nanoparticle Research**. 11:1(2009) 231. DOI: 10.1007/s11051-008-9499-4.

BHATTACHARYA, K.; DAVOREN, M.; BOERTZ, J.; SCHINS, R.P.; HOFFMANN, E.; DOPP, E. - Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. **Particle and Fibre Toxicology**. 6:17 (2009). DOI: 10.1186/1743-8977-6-17.

BIVER, T.; ELTUGRAL, N.; PUCCI, A.; RUGGERI, G.; SCHENA, A.; SECCOA, F.; VENTURINIA, M. - Synthesis, characterization, DNA interaction and potential applications of gold nanoparticles functionalized with Acridine Orange fluorophores. **Dalton Transactions**. 40: 16 (2011 Apr 28) 4190-9.

BOERRIGTER, M.E.; DOLLÉ, M.E.; MARTUS, H.J.; GOSSEN, J.A.; VIJG, J. - Plasmid-based transgenic mouse model for studying *in vivo* mutations. **Nature**. 377 (1995) 657-659.

BOERRIGTER, M.E.; VIJG, J. - Sources of variability in mutant frequency determinations in different organs of *LacZ* plasmid-based transgenic mice: experimental features and statistical analysis. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 29 (1997) 221-229.

BOFFETTA, P.; GABORIEAU, V.; NADON, L.; PARENT, M.F.; WEIDERPASS, E.; SIEMIATYCKI, J. - Exposure to titanium dioxide and risk of lung cancer in a population-

based study from Montreal. **Scandinavian Journal of Work, Environment & Health.** 27:4 (2001) 227-232.

BOISEN, A.M.; SHIPLEY, T.; JACKSON, P.; HOUGAARD, K.S.; WALLIN, H.; YAUK, C.L.; VOGEL, U. - NanoTiO₂ (UV-Titan) does not induce ESTR mutations in the germline of prenatally exposed female mice. **Particle and Fibre Toxicology.** 9: 19 (2012). DOI: 10.1186/1743-8977-9-19.

BONASSI, S.; EL-ZEIN, R.; BOLOGNESI, C.; FENECH, M. - Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. **Mutagenesis** 26:1 (2011) 93-100.

BOVERHOF, D.R.; CHAMBERLAIN, M.P.; ELCOMBE, C.R.; GONZALEZ, F.J.; HEFLICH, R.H.; HERNÁNDEZ, L.G.; JACOBS, A.C.; JACOBSON-KRAM, D.; LUIJTEN, M.; MAGGI, A.; MANJANATHA, M.G.; BENTHEM, J., GOLLAPUDI, B.B. - Transgenic animal models in toxicology: historical perspectives and future outlook. **Toxicological Sciences.** 121: 2 (2011) 207-233.

BOVERHOF, D.R.; DAVID, R.M. - Nanomaterial characterization: considerations and needs for hazard assessment and safety evaluation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry.** 396: 3 (2010) 953-961.

BRASSEUR, G.; BONDEELLÉ, A. - La Revolution "Nano". **Travail&Sécurité.** (Juillet_Aôut. 2010) 21-37.

BROUWER, D.; BERGES, M.; VIRJI, M.A.; FRANSMAN, W.; BELLO, D.; HODSON, L.; GABRIEL, S.; TIELEMANS, E. - Harmonization of measurement strategies for exposure to manufactured nano-objects; report of a workshop. **The Annals of Occupational Hygiene.** 56: 1 (2012) 1-9.

BUSUTTIL, R.; BAHAR, R.; VIJG, J. - Genome dynamics and transcriptional deregulation in aging. **Neuroscience.** 145: 4 (2007 Apr 14) 1341-1347.

BUZEA, C.; PACHECO, I.; ROBBIE, K. - Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. **Biointerphases.** 2: 4 (December 2007) 17- 71.

CASIMIRO, E.; SANTOS, S. – Investigação em Nanotecnologia e Nanosegurança em Portugal. In Encontro Nacional de Nanotoxicologia: E2N2011. Lisboa : INETI, 2011.

CATALÁN, J.; JARVENTAUS, H.; VIPPOLA, M.; SAVOLAINEN, K.; NORPPA, H. - Induction of chromosomal aberrations by carbon nanotubes and titanium dioxide nanoparticles in human lymphocytes *in vitro*. **Nanotoxicology**. 6:8 (Dec 2012) 25-36.

CAVALLO, D.; FANIZZA, C.; URSINI, C.L.; CASCIARDI, S.; PABA, E.; CIERVO, A.; FRESEGNA, A.M.; MAIELLO, R.; MARCELLONI, A.M.; BURESTI, G.; TOMBOLINI, F.; BELLUCCI, S.; IAVICOLI, S. - Multi-walled carbon nanotubes induce cytotoxicity and genotoxicity in human lung epithelial cells. **Journal of Applied Toxicology**. 32:6 (Jun 2012) 454-64.

CEPPI, M.; GALLO, F.; BONASSI, S. - Study design and statistical analysis of data in human population studies with the micronucleus assay. **Mutagenesis** 26: 1(2011) 247-252.

COLLINS, A.; OSCOZ, A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C.; STETINA, R. - The comet assay: topical issues. **Mutagenesis** 23: 3 (2008) 143-151.

COMISSÃO EUROPEIA – Commission Recommendation of 07/02/2008 on a code of conduct for responsible nanosciences and nanotechnologies research. C(2008) 424 final, 2008.

COMISSÃO EUROPEIA - Commission staff working paper: Types and uses of nanomaterials, including safety aspects, Accompanying the Communication from the Commission to the European Parliament, the Council and the European Economic and Social Committee on the Second Regulatory Review on Nanomaterials. 572, 2012a.

COMISSÃO EUROPEIA - Comunicação da Comissão ao Parlamento Europeu, ao Conselho e ao Comité Económico e Social Europeu: Segunda revisão regulamentar relativa a «nanomateriais». Bruxelas, 2012b.

COMISSÃO EUROPEIA - Directiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Setembro de 2010 relativa à protecção dos animais utilizados para fins científicos. **Jornal Oficial da União Europeia**. L 276 (20.10.2010) 33-79, 2010.

COMISSÃO EUROPEIA - Directiva 86/609/CEE do Conselho das Comunidades Europeias relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas dos Estados-membros respeitantes à protecção dos animais utilizados

para fins experimentais e outros fins científicos. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**. L358 (18-12-1986) 1-28, 1986.

COMISSÃO EUROPEIA – Follow-up to the 6th Meeting of the REACH Competent Authorities for the implementation of Regulation (EC) 1907/2006 (REACH): Nanomaterials in REACH. In DIRECTORATE-GENERAL ED-GEAI (ed.), CA/59/2008 rev. 1, 2008b.

COMISSÃO EUROPEIA – NANOMEDICINE 2020: Contribution of Nanomedicine to Horizon 2020. European Technology Platform on NanoMedicine Publications, 2013. Disponível em <http://www.etp-nanomedicine.eu>.

COMISSÃO EUROPEIA – Recomendação da Comissão de 18 de Outubro de 2011 sobre a definição de nanomaterial (2011/696/UE). **Jornal Oficial da União Europeia**. L 275/38 (20-10-2011). Bruxelas, 2011.

CONOLLY, R.B.; LUTZ, W.K. – Non-monotonic dose-response relationships: mechanistic basis, kinetic modeling, and implications for risk assessment. **Toxicological Sciences**. 77 (2004) 151-157.

CORRADI, S.; GONZALEZ, L.; THOMASSEN, L.C.; BILANICOVA, D.; BIRKEDAL, R.K.; POJANA, G.; MARCOMINI, A.; JENSEN, K.A.; LEYNS, L.; KIRSCH-VOLDERS, M. - Influence of serum on in situ proliferation and genotoxicity in A549 human lung cells exposed to nanomaterials. **Mutation Research**. 745: (2012) 21-27.

CVETICANIN, J.; JOKSIC, G.; LESKOVAC, A.; PETROVIC, S.; SOBOT, A.V.; NESKOVIC, O. - Using carbon nanotubes to induce micronuclei and double strand breaks of the DNA in human cells. **Nanotechnology**. 21(2010) 015102. doi:10.1088/0957-4484/21/1/015102

DECRETO-LEI n.º 129/92, D.R. Iª Série - A, 153 (06-07-1992) 3197-3198.

DE JONG, W.; JACOBSEN, N. R.; WALLIN, H.; OOMEN, A.; BRANDON, E.; KRYSTEK, P.; APOSTOLOVA, M.; KARADJOVA, I.; CUBADDA, F.; AURELI, F.; MARANGHI, F.; DIVE, V.; TARAN, F.; CZARNY, B. - Deliverable 7: Identification of target organs and biodistribution including ADME parameters. NANOGENOTOX Joint Action. March 2013. Disponível em www.nanogenotox.eu.

DHILLON, V.S.; THOMAS, P.; IARMARCOVALI, G.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; FENECH, M. - Genetic polymorphisms of genes involved in DNA repair and metabolism influence micronucleus frequencies in human peripheral blood lymphocytes. **Mutagenesis** 26: 1(2011) 33-42.

DI GIORGIO, M.L.; DI BUCCHIANICO, S.; RAGNELLI, A.M.; AIMOLA, P.; SANTUCCI, S.; POMA, A. - Effects of single and multiwalled carbon nanotubes on macrophages: cyto and genotoxicity and electron microscopy. **Mutation Research**. 722 (2011) 20-31.

DRISCOLL, K.E.; DEYO, L.C.; CARTER, J.M.; HOWARD, B.W.; HASSENBEIN, D.G.; BERTRAM, T.A. - Effects of particle exposure and particle-elicited inflammatory cells on mutation in rat alveolar epithelial cells. **Carcinogenesis**. 18: 2(1997) 423-430.

DUFOUR, E.K.; KUMARAVEL, T.; NOHYNEK, G.J.; KIRKLAND, D.; TOUTAIN, H. - Clastogenicity, photo-clastogenicity or pseudo-photo-clastogenicity: Genotoxic effects of zinc oxide in the dark, in pre-irradiated or simultaneously irradiated Chinese hamster ovary cells. **Mutation Research**. 607 (2006) 215-224.

DUNFORD, R.; SALINARO, A.; CAI, L.; SERPONE, N.; HORIKOSHI, S.; HIDAKA, H.; KNOWLAND, J. - Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients. **FEBS Letters**. 418 (1997) 87-90.

DUSINSKA, M.; COLLINS, A. - The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. **Mutagenesis**. 23 (2008) 191-205.

EASTMOND, D.A.; HARTWIG, A.; ANDERSON, D.; ANWAR, W.A.; CIMINO, M.C.; DOBREV, I.; DOUGLAS, G.R.; NOHMI, T.; PHILLIPS, D.H.; VICKERS, C. - Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. **Mutagenesis**. 24 (2009) 341-349.

EEA - EUROPEAN ENVIRONMENT AGENCY - Late lessons from early warnings: the precautionary principle 1896-2000. **Environmental issue report** no.22. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2001.

EEA - EUROPEAN ENVIRONMENT AGENCY - Late lessons from early warnings: science, precaution, innovation. **EEA Report** No 1. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2013.

EFSA - EUROPEAN FOOD AND SAFETY AUTHORITY. Minimum Criteria for the acceptance of *in vivo* alkaline Comet Assay Reports. **EFSA Journal**. 10:11 (2012) 2977-2999.

EKSTRAND-HAMMARSTROM, B.; AKFUR, C.M.; ANDERSSON, P.O.; LEJON, C.; OSTERLUND, L.; BUCHT, A. - Human primary bronchial epithelial cells respond differently to titanium dioxide nanoparticles than the lung epithelial cell lines A549 and BEAS-2B. **Nanotoxicology**. 6 (2012) 623-634.

EMA, M.; IMAMURA, T.; SUZUKI, H.; KOBAYASHI, N.; NAYA, M.; NAKANISHI, J. - Evaluation of genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in a battery of *in vitro* and *in vivo* assays. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. 63 (2012) 188-195.

EMA, M.; MASUMORI, S.; KOBAYASHI, N.; NAYA, M.; ENDOH, S.; MARU, J.; HOSOI, M.; UNO, F.; NAKAJIMA, M.; HAYASHI, M.; NAKANISHI, J. - *In vivo* comet assay of multi-walled carbon nanotubes using lung cells of rats intratracheally instilled. **Journal of Applied Toxicology**. 33:10 (Oct 2013) 1053-60.

EMA - EUROPEAN MEDICINES AGENCY - ICH Topic S1A: The Need for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals, 1996. Disponível em <http://www.ema.europa.eu>.

EMA - EUROPEAN MEDICINES AGENCY - ICH Topic S1B: Carcinogenicity: Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals, 1998. Disponível em <http://www.ema.europa.eu>.

EMA - EUROPEAN MEDICINES AGENCY - ICH Topic S2(R1): Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use, 2008. Disponível em <http://www.ema.europa.eu>.

EUGÉNIO, J.; FATAL, V. - Evolução da Nanotecnologia- Abordagem Nacional e Internacional. Instituto Nacional da Propriedade Industrial, 2010.

EU-OSHA- EUROPEAN AGENCY FOR SAFETY AND HEALTH AT WORK. Expert forecast on emerging chemical risks related to occupational safety and health. European risk observatory report, 2009.

EU-OSHA- EUROPEAN AGENCY FOR SAFETY AND HEALTH AT WORK. - The risks of the very small. News release. (Jun 20, 2012). Disponível em https://osha.europa.eu/en/press/press-releases/risks_of_very_small.

FABIAN, E.; LANDSIEDEL, R.; MA-HOCK, L.; WIENCH, K.; WOHLLEBEN, W.; VAN RAVENZWAAY, B. - Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. **Archives of Toxicology**. 82: (2008) 151-157.

FAGIN, D. - Toxicology: The learning curve. **Nature News**. 490 (2012) 462.

FALCK, G.C.; LINDBERG, H.K.; SUHONEN, S.; VIPPOLA, M.; VANHALA, E.; CATALAN, J.; SAVOLAINEN, K.; NORPPA, H. - Genotoxic effects of nanosized and fine TiO₂. **Human & Experimental Toxicology**. 28 (2009) 339-352.

FENECH, M. - Cytokinesis-blocked micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**. 2 (2007) 1084-1104.

FENECH, M. - Nutritional treatment of genome instability: a paradigm shift in disease prevention and in the setting of recommended dietary allowances. **Nutrition Research Reviews**. 16 (2003) 109-122.

FENECH, M. - The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**. 455 (2000): 81-95.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A.T.; SURRALLES, J.; CROTT, J.W.; PARRY, J.; NORPPA, H.; EASTMOND, D.A.; TUCKER, J.D.; THOMAS, P. - Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**. 26 (2011) pp. 125-132.

FERREIRA, A.J.; CEMLYN-JONES, J.; CORDEIRO, C.R. - Nanoparticles, nanotechnology and pulmonary nanotoxicology. **Revista Portuguesa de Pneumologia**. 19:1(Jan-Feb 2013) 28-37.

FEYNMAN, R.P. - There's Plenty of Room at the Bottom. **Engineering and Science**. 23: 5 (1960) 22-36.

FOSTER, K.A.; OSTER, C.G.; MAYER, M.M.; AVERY, M.L.; AUDUS, K.L. - Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. **Experimental Cell Research**. 243: 2(1998) 359-366.

GERLOFF, K.; ALBRECHT, C.; BOOTS, A.W.; FORSTER, I.; SCHINS, R.P.F. - Cytotoxicity and oxidative DNA damage by nanoparticles in human intestinal Caco-2 cells. **Nanotoxicology**. 3: 4 (2009) 355-364.

GERNAND, J.M.; CASMAN, E.A. - A Meta-Analysis of Carbon Nanotube Pulmonary Toxicity Studies-How Physical Dimensions and Impurities Affect the Toxicity of Carbon Nanotubes. **Risk Analysis** (September 2013). DOI: 10.1111/risa.12109.

GHOSH, M., CHAKRABORTY A, MUKHERJEE A (2013) Cytotoxic, genotoxic and the hemolytic effect of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on human erythrocyte and lymphocyte cells *in vitro*. **Journal of Applied Toxicology**. 33: 10 (October 2013) 1097–1110.

GHOSH, M.; BANDYOPADHYAY, M.; MUKHERJEE, A. - Genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles at two trophic levels: plant and human lymphocytes. **Chemosphere**. 81 (2010) 1253–1262.

GHOSH, M.; CHAKRABORTY, A.; BANDYOPADHYAY, M.; MUKHERJEE, A. - Multi-walled carbon nanotubes (MWCNT): Induction of DNA damage in plant and mammalian cells. **Journal of Hazardous Materials**. 197 (15 December 2011) 327-336.

GONZALEZ, L.; SANDERSON, B.J.; KIRSCH-VOLDERS, M. - Adaptations of the *in vitro* micronúcleo assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials. **Mutagenesis**. 26 (2011) 185-191.

GOPALAN, R.C.; OSMAN, I.F.; AMANI, A.; DE MATAS, M.; ANDERSON, D. - The effect of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles in the Comet assay with UVA photoactivation of human sperm and lymphocytes. **Nanotoxicology**. 3:1 (March 2009) 33-39.

GOSSEN, J.A.; DE LEEUW, W.J.; MOLIJN, A.C.; VIJG, J. - Plasmid rescue from transgenic mouse DNA using LacI repressor protein conjugated to magnetic beads. **Biotechniques**. 14 (1993) 624-629.

GOSSEN, J.A.; DE LEEUW, W.J.; TAN, C.H.; ZWARTHOFF, E.C.; BERENDS, F.; LOHMAN, P.H.; KNOOK, D.L.; VIJG, J. - Efficient rescue of integrated shuttle vectors from transgenic mice: a model for studying mutations *in vivo*. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**. 86 (1989) 7971-7975.

GOSSEN, J.A.; MARTUS, H.J.; WEI, J.Y.; VIJG, J. - Spontaneous and X-ray-induced deletion mutations in a *LacZ* plasmid-based transgenic mouse model. **Mutation Research**. 331 (1995) 89-97.

GOTTSCHALK, F.; KOST, E.; NOWACK, B. - Engineered nanomaterials in water and soils: a risk quantification based on probabilistic exposure and effect modeling. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 32: 6 (2013) 1278-1287.

GOTTSCHALK, F.; NOWACK, B. - The release of engineered nanomaterials to the environment. **Journal of Environmental Monitoring**. 13 (2011) 1145-1155.

GOU, N.; GU, A.Z. - A new Transcriptional Effect Level Index (TELI) for toxicogenomics-based toxicity assessment. **Environmental Science & Technology**. 45:12 (2011) 5410-7.

GRIEGER, K.D.; BAUN, A.; OWEN, R. - Redefining risk research priorities for nanomaterials. **Journal of Nanoparticle Research**. 12 (2010) 383-392.

GUICHARD, Y.; SCHMIT, J.; DARNE, C.; GATE, L.; GOUTET, M.; ROUSSET, D.; RASTOIX, O.; WROBEL, R.; WITSCHGER, O.; MARTIN, A.; FIERRO, V.; BINET, S. - Cytotoxicity and genotoxicity of nanosized and micro-sized titanium dioxide and iron oxide particles in Syrian hamster embryo cells. **Annals of Occupational Hygiene**. 56:5 (2012) 631-644.

GÜMÜS, D.; BERBER, A.A.; ADA, K.; AKSOY, H. - *In vitro* genotoxic effects of ZnO nanomaterials in human peripheral lymphocytes. **Cytotechnology**. (2013 Jun 21). DOI: 10.1007/s10616-013-9575-1.

GUO, Y.Y.; ZHANG, J.; ZHENG, Y.F.; YANG, J.; ZHU, X.Q. - Cytotoxic and genotoxic effects of multi-wall carbon nanotubes on human umbilical vein endothelial cells *in vitro*. **Mutation Research**. 721: 2 (2011 Apr 3) 184-91.

GURR, J.R.; WANG, A.S.; CHEN, C.H.; JAN, K.Y. - Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. **Toxicology**. 213: 1-2 (2005) 66-73.

HACKENBERG S, SCHERZED A, TECHNAU A, KESSLER M, FROELICH K, GINZKEY C, KOEHLER C, BURGHARTZ M, HAGEN R, KLEINSASSER N (2011b)

Cytotoxic, genotoxic and pro-inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles in human nasal mucosa cells *in vitro*. **Toxicology In vitro**. 25: 3 (2013 Apr) 657-63.

HACKENBERG, S.; FRIEHS, G; FROELICH, K.; GINZKEY, C.; KOEHLER, C.; SCHERZED, A.; BURGHARTZ, M.; HAGEN, R.; KLEINSASSER, N. - Intracellular distribution, geno- and cytotoxic effects of nanosized titanium dioxide particles in the anatase crystal phase on human nasal mucosa cells. **Toxicology Letters**. 195: (2010) 9-14.

HACKENBERG, S.; FRIEHS, G; KESSLER, M.; FROELICH, K.; GINZKEY, C.; KOEHLER, C.; SCHERZED, A.; BURGHARTZ, M.; KLEINSASSER, N. - Nanosized titanium dioxide particles do not induce DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. **Environmental and Molecular Mutagenesis** 52 (2011a) 264-268.

HAMZEH, M.; SUNAHARA, G.I. - *In vitro* cytotoxicity and genotoxicity studies of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in Chinese hamster lung fibroblast cells. **Toxicology In vitro**. 27 (2013) 864-873.

HAN, J.H.; LEE, E.J.; LEE, J.H.; SO, K.P.; LEE, Y.H.; BAE, G.N.; LEE, S.B.; JI J.H.; CHO, M.H.; YU, I.J. - Monitoring multiwalled carbon nanotube exposure in carbon nanotube research facility. **Inhalation Toxicology**. 20 (2008) 741-749.

HAN, X.; CORSON, N.; WADE-MERCER, P.; GELEIN, R.; JIANG, J.; SAHU, M.; BISWAS, P.; FINKELSTEIN, J.N.; ELDER, A.; OBERDORSTER, G. - Assessing the relevance of *in vitro* studies in nanotoxicology by examining correlations between *in vitro* and *in vivo* data. **Toxicology**. 297 (2012) 1-9.

HANDY, R.D.; SHAWN, B.J. - Toxic effects of nanoparticles and nanomaterials: Implications for public health, risk assessment and the public perception of nanotechnology. **Health, Risk & Society**. 9: 2 (2007) 125-144.

HANKIN, S.; BORASCHI, D.; DUSCHL, A.; LEHR, C.; HERA, M.L. - Towards nanotechnology regulation — Publish the unpublishable. **Nano Today**. 6 (2011) 228-231.

HARTMANN, A.; ELHAJOUJI, A.; KISKINIS, E.; POETTER, F.; MARTUS, H.; FJALLMAN, A.; FRIEAUFF, W.; SUTER, W. - Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**. 39 (2001) 843-858.

HASHIMOTO, K.; NAKAJIMA, Y.; MATSUMURA, S.; CHATANI, F. - Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. 59 (2011) 28-36.

HEDDLE, J.A.; DEAN, S.; NOHMI, T.; BOERRIGTER, M.; CASCIANO, D.; DOUGLAS, G.R.; GLICKMAN, B.W.; GORELICK, N.J.; MIRSALIS, J.C.; MARTUS, H.J.; SKOPEK, T.R.; THYBAUD, V.; TINDALL, K.R.; YAJIMA, N. - *In vivo* transgenic mutation assays. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 35 (2000) 253-259.

HERZOG, E.; CASEY, A.; LYNG, F.; CHAMBERS, G.; BYRNE, H.; DAVOREN, M. - A new approach to the toxicity testing of carbon-based nanomaterials--the clonogenic assay. **Toxicology Letters**. 174 (2007) 49-60.

HIRANO, S.; FUJITANI, Y.; FURUYAMA, A.; KANNO, S. - Uptake and cytotoxic effects of multi-walled carbon nanotubes in human bronchial epithelial cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 249 (2010) 8-15.

HOEIJMAKERS, J.H. - Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**. 411: 6835 (2001 May 17) 366-74.

HOLSAPPLE, M.P.; WALLACE, K.B. - Dose response considerations in risk assessment- an overview of recent ILSI activities. **Toxicology Letters**. 180 (2008) 85-92.

HU, X.; COOK, S.; WANG, P.; HWANG, H.M.; LIU, X.; WILLIAMS, Q.L. - *In vitro* evaluation of cytotoxicity of engineered carbon nanotubes in selected human cell lines. **Science of Total Environment**. 408 (2010) 1812-1817.

HUYNH, N.T.; PASSIRANI, C.; SAULNIER, P.; BENOIT, J.P. - Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine. **International Journal of Pharmaceutics**. 379 (2009) 201-209.

HWANG, Y.J.; JEUNG, Y.S.; SEO, M.H.; YOON, J.Y.; KIM, D.Y.; PARK, J.W.; HAN, J.H.; JEONG, S.H. - Asian dust and titanium dioxide particles-induced inflammation and oxidative DNA damage in C57BL/6 mice. **Inhalation Toxicology**. 22:13 (2010 Nov) 1127-33.

IARC- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans- Volume 93: Carbon Black, Titanium Dioxide and Talc. Lyon: World Health Organization, 2010.

ICH - INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY - Principles for modelling dose-response for the risk assessment of chemicals., 2009

ICH - INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY - S2 (R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use, 2012. Disponível em <http://www.ich.org/>.

IPQ- INSTITUTO PORTUGUÊS DA QUALIDADE. NP 405-1: 1994: informação e documentação: referências bibliográficas: documentos impressos. Lisboa: Instituto Português da Qualidade, 1995.

IPQ- INSTITUTO PORTUGUÊS DA QUALIDADE. NP 405-4: 2001: informação e documentação: referências bibliográficas: documentos electrónicos. Lisboa: Instituto Português da Qualidade, 2001.

JACKSON, P.; HOUGAARD, K.S.; VOGEL, U.; WU, D.; CASAVANT, L.; WILLIAMS, A.; WADE, M.; YAU, C.L.; WALLIN, H.; HALAPPANAVAR, S. - Exposure of pregnant mice to carbon black by intratracheal instillation: Toxicogenomic effects in dams and offspring. **Mutation Research**. 745:1-2 (2012 Jun 14) 73-83.

JACOBSEN, N.; POJANA, G.; WHITE, P.; MØLLER, P.; COHN, C.; KORSHOLM, K.; VOGEL, U.; MARCOMINI, A.; LOFT, S.; WALLIN, H. - Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by single-walled carbon nanotubes and C(60) fullerenes in the FE1-MutaTMMouse lung epithelial cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 49 (2008) 476-487.

JAEGER, A.; WEISS, D.G.; JONAS, L.; KRIEHLER, R. - Oxidative stress-induced cytotoxic and genotoxic effects of nano-sized titanium dioxide particles in human HaCaT keratinocytes. **Toxicology**. 296 (2012) 27-36.

JENSEN, K.A.; KEMBOUCHE, Y.; CHRISTIANSEN, E.; JACOBSEN, N.R.; WALLIN, H.; GUIOT, C.; SPALLA, O.; WITSCHGER, O. - Report: The generic NANOGENOTOX dispersion protocol – Standard Operation Procedure (SOP) and background documentation: NANOGENOTOX Joint Action, July 2011. Disponível em : <http://www.NANOGENOTOX.eu>

JOHANSSON, C.; MOLLER, P.; FORCHHAMMER, L.; LOFT, S.; GODSCHALK, R.W.; LANGIE, S.A.; LUMEIJ, S.; JONES, G.D.; KWOK, R.W.; AZQUETA, A.; PHILLIPS, D.H.; SOZERI, O.; ROUTLEDGE, M.N.; CHARLTON, A.J.; RISO, P.; PORRINI, M.; ALLIONE, A.; MATULLO, G.; PALUS, J.; STEPNIK, M.; COLLINS, A.R.; MOLLER, L. - An ECVAG trial on assessment of oxidative damage to DNA measured by the comet assay. **Mutagenesis**. 25 (2010) 125-132.

JRC - JOINT RESEARCH CENTER - Impact of Engineered Nanomaterials on Health: Considerations for Benefit-Risk Assessment - EASAC Policy Report - JRC Reference Report. Brussels: European Union, 2011a. Disponível em: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/111111111/22610/1/impact%20of%20engineered%20nanomaterials%20on%20health.pdf>.

JRC - JOINT RESEARCH CENTER - List of materials in the JRC Nanomaterials (NM) Repository. 2011b. Disponível em http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/nanotechnology/nanomaterials-repository.

JUGAN, M.L.; BARILLET, S.; SIMON-DECKERS, A.; HERLIN-BOIME, N.; SAUVAIGO, S.; DOUKI, T.; CARRIERE, M. - Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells. **Nanotoxicology**. 6:5 (2012 Aug) 501-13.

KANG, S., B. KIM, Y. LEE & H. CHUNG - Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 49 (2008) 399-405.

KANG, S., KIM, B. LEE, Y.; CHUNG, H. - Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 49 (2008) 399-405.

KAO, Y.Y.; CHEN, Y.C.; CHENG, T.J.; CHIUNG, Y.M.; LIU, P.S. - Zinc oxide nanoparticles interfere with zinc ion homeostasis to cause cytotoxicity. **Toxicological Sciences**. 125: 2 (2012) 462-472.

KARLSSON, H.; CRONHOLM, P.; GUSTAFSSON, J.; MÖLLER, L. - Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. **Chemical Research in Toxicology**. 21 (2008) 1726-1732.

KATO, T.; TOTSUKA, Y.; ISHINO, K.; MATSUMOTO, Y.; TADA, Y.; NAKAE, D.; GOTO, S.; MASUDA, S.; OGO, S.; KAWANISHI, M.; YAGI, T.; MATSUDA, T.; WATANABE, M.; WAKABAYASHI, K. - Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both *in vitro* and *in vivo* assay systems. **Nanotoxicology**. 7:4 (2013 Jun) 452-61.

KERMANIZADEH, A.; GAISER, B.K.; HUTCHISON, G.R.; STONE, V. - An *in vitro* liver model - assessing oxidative stress and genotoxicity following exposure of hepatocytes to a panel of engineered nanomaterials. **Particle and Fibre Toxicology**. 19 (2012) 9-28.

KERMANIZADEH, A.; POJANA, G.; GAISER, BK.; BIRKEDAL, R.; BILANIČOVÁ, D.; WALLIN, H.; JENSEN, KA.; SELLERGREN, B.; HUTCHISON, GR.; MARCOMINI, A.; STONE, V. - *In vitro* assessment of engineered nanomaterials using a hepatocyte cell line: cytotoxicity, pro-inflammatory cytokines and functional markers. **Nanotoxicology**. 7:3 (2013b) 301-13.

KERMANIZADEH, A.; VRANIC, S.; BOLAND, S.; MOREAU, K.; BAEZA-SQUIBAN, A.; GAISER, BK.; ANDRZEJCZUK, LA.; STONE, V. An *in vitro* assessment of panel of engineered nanomaterials using a human renal cell line: cytotoxicity, pro-inflammatory response, oxidative stress and genotoxicity. **BMC Nephrology**. 14 (2013a) 96.

KIM, J.S.; LEE, K.; LEE, Y.H.; CHO, H.S.; KIM, K.H.; CHOI, K.H.; LEE, S.H.; SONG, K.S.; KANG, C.S.; YU, I.J. - Aspect ratio has no effect on genotoxicity of multi-wall carbon nanotubes. **Archives of Toxicology**. 85 (2011) 775-786.

KISIN, E.; MURRAY, A.; KEANE, M.; SHI, X.; SCHWEGLER-BERRY, D.; GORELIK, O.; AREPALLI, S.; CASTRANOVA, V.; WALLACE, W.; KAGAN, V.; SHVEDOVA, A. - Single-walled carbon nanotubes: geno- and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells. **Journal of Toxicology and Environmental Health A**. 70 (2007) 2071-2079.

KISIN, E.R.; MURRAY, A.R.; SARGENT, L.; LOWRY, D.; CHIRILA, M.; SIEGRIST, K.J.; SCHWEGLER-BERRY, D.; LEONARD, S.; CASTRANOVA, V.; FADEEL, B.; KAGAN, V.E.; SHVEDOVA, A.A. - Genotoxicity of carbon nanofibers: are they potentially more or less dangerous than carbon nanotubes or asbestos? **Toxicology and Applied Pharmacology**. 252 (2011) 1-10.

KLEIN, C.L.; WIENCH, K.; WIEMANN, M.; MA-HOCK, L.; VAN RAVENZWAAY, B.; LANDSIEDEL, R. - Hazard identification of inhaled nanomaterials: making use of short-term inhalation studies. **Archives of Toxicology**. 86 (2012) 1137-1151.

KLIEN, K.; GODNIĆ-CVAR, J. - Genotoxicity of metal nanoparticles: focus on *in vivo* studies. **Arh Hig Rada Toksikol**. 63 (2012) 133-145.

KREUPL, F.; GRAHAM, AP.; LIEBAU, M.; DUESBERG, G.S.; SEIDEL, R.; UNGER, E. - Carbon Nanotubes for Interconnect Applications. In Electron Devices Meeting IEDM Technical Digest. IEEE International, 2004. 683 – 686. DOI: 10.1109/IEDM.2004.1419261.

KRISHNA, G.; URDA, G.; THEISS, J. - Principles and practices of integrating genotoxicity evaluation into routine toxicology studies: a pharmaceutical industry perspective. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 32 (1998) 115-120.

KUMARI, M.; KHAN, S.S.; PAKRASHI, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. - Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. **Journal of Hazardous Materials**. 190 (2011) 613-621.

LABOUTA, H.I.; EL-KHORDAGUI, L.K.; KRAUS, T.; SCHNEIDER, M. - Mechanism and determinants of nanoparticle penetration through human skin. **Nanoscale**. 3 (2011) 4989-4999.

LANDSIEDEL, R.; MA-HOCK, L.; VAN RAVENZWAAY, B.; SCHULZ, M.; WIENCH, K. CHAMP, S.; SCHULTE, S.; WOHLLEBEN, W.; OESCH, F. - Gene toxicity studies on titanium dioxide and zinc oxide nanomaterials used for UV-protection in cosmetic formulations. **Nanotoxicology** 4 (2010) 364–381.

LANONE, S.; ANDUJAR, P.; KERMANIZADEH, A.; BOCZKOWSKI, J. - Determinants of carbon nanotube toxicity. **Advanced Drug Delivery Reviews**. (2013 Aug 6). doi: 10.1016/j.addr.2013.07.019.

LEE, J.H.; LEE, S.B.; BAE, G.N.; JEON, K.S.; YOON, J.U.; JI, J.H.; SUNG, J.H.; LEE, B.G.; YANG, J.S.; KIM, H.Y.; KANG, C.S.; YU, I.J. - Exposure assessment of carbon nanotube manufacturing workplaces. **Inhalation Toxicology**. 22 (2010) 369-381.

LI, N.; MA, L.; WANG, J.; ZHENG, L.; LIU, J.; DUAN, Y.; LIU, H.; ZHAO, X.; WANG, S.; WANG, H.; HONG, F.; XIE, Y. - Interaction Between Nano-Anatase TiO₂ and Liver DNA from Mice *In vivo*. **Nanoscale Res Lett.** 5: 1 (2010) 108-115.

LIN, W.; XU, Y.; HUANG, C.-C.; MA, Y.; SHANNON, K.B.; CHEN, D.-R.; HUANG, Y.-W. - Toxicity of nano- and micro-sized ZnO particles in human lung epithelial cells. **Journal of Nanoparticle Research.** 11 (2009) 25–39. LINDAHL, M.; LEANDERSON, P.; TAGESSON, C. - Novel aspect on metal fume fever: zinc stimulates oxygen radical formation in human neutrophils. **Human & Experimental Toxicology.** 17 (1998) 105-110.

LINDBERG HK, FALCK GC, SINGH R, SUHONEN S, JARVENTAUS H, VANHALA E, CATALAN J, FARMER PB, SAVOLAINEN KM, NORPPA H (2013) Genotoxicity of short single-wall and multi-wall carbon nanotubes in human bronchial epithelial and mesothelial cells *in vitro*. **Toxicology** (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2012.12.008>.

LINDBERG HK.; FALCK GC.; CATALAN J.; KOIVISTO AJ.; SUHONEN S.; JARVENTAUS H.; ROSSI EM.; NYKASENOJA H.; PELTONEN Y.; MORENO C.; ALENIUS H.; TUOMI T.; SAVOLAINEN KM.; NORPPA H Genotoxicity of inhaled nanosized TiO₂ in mice. **Mutation Research.** 745 (2012) 58-64.

LINDBERG HK.; FALCK GCM.; SUHONEN S.; VIPPOLA M.; VANHALA E.; CATALAN J.; SAVOLAINEN K.; NORPPA H (2009) Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells *in vitro*. **Toxicology Letters.** 186: 166-173.

LINDBERG, H.; FALCK, G.; SUHONEN, S; VIPPOLA, M.; VANHALA, E.; CATALAN, J.; SAVOLAINEN, K., NORPPA, H. - Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells *in vitro*. **Toxicology Letters.** 186 (2009) 166-173.

LINKS JM. - Principles of Exposure, Dose, and Response. Johns Hopkins University, 2006. Disponível em:

<http://ocw.jhsph.edu/courses/environmentalhealth/PDFs/Lecture5.pdf>

Linnainmaa, K.; Kivipensas, P.; VAINIO, H. - Toxicity and cytogenetic studies of ultrafine titanium dioxide in cultured rat liver epithelial cells. **Toxicology *In vitro***. 11 (1997) 329-335.

LONGO-SORBELLO, G.S.A.; SAYDAM, G.; BANERJEE, D.; BERTINO, J.R. Cytotoxicity and Cell Growth Assays. In Cell Biology - A laboratory handbook, Celis JE (ed), Vol. 1, 3rd edn. Copenhaga: Elsevier Academic Press, 2006.

LOURO, H., SILVA, M.J. - Cost/benefit of mutation induction under PARP1 deficiency: from genomic instability to therapy. In: Advances in Genetics Research. Volume 4, Ed. Kevin V. Urbano, Nova Science Publishers, Inc., NY, 2011.

LOURO, H.; BORGES, T.; SILVA, M.J. **Nanomateriais manufaturados – Novos desafios para a saúde pública. Revista Portuguesa de Saúde Pública**. 31 (2013) 145-57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rpsp.2012.12.004>.

LOURO, H.; FAUSTINO, I.; DIAS, A.; BOAVIDA, M.G.; SILVA, M.J. - Poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficiency does not affect ethylnitrosourea mutagenicity in liver and testis of *LacZ* transgenic mice. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 51 (2010) 322-329.

LOURO, H.; PINHEIRO, I.; COSTA, P.; SOUSA, C.; DIAS, A.; BOAVIDA, M.G.; SILVA, M.J. - Mutagenic effects of poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficiency in transgenic mice. **Mutation Research**. 640: 1-2 (2008 Apr 2) 82-8.

LOURO, H.; SILVA, M.J. - *In vivo* mutagenic effects of genotoxic agents eliciting different DNA-adducts. In: DNA Adducts: Formation, Detection and Mutagenesis. Ed. By Emerson Alvarez and Roberto Cunha, pp. 39-60, Nova Publishers, NY, 2010.

LOURO, H.; SILVA, M.J.; BOAVIDA, M.G. - Mutagenic activity of cisplatin in the *LacZ* plasmid-based transgenic mouse model. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 40 :4 (2002) 283-291.

LOURO, H.; TAVARES, A.; VITAL, N.; COSTA, P.M.; ALVERCA, E.; ZWART, E.; DE JONG, W.H.; FESSARD, V.; LAVINHA, J.; SILVA, M.J. - Integrated approach to the *in vivo* genotoxic effects of a titanium dioxide nanomaterial using *LacZ* plasmid-based transgenic mice. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. (2013a) *em revisão*.

LOURO, H.; TAVARES, A.; LEITE, E.; SILVA, M.J. - Nanotecnologias e saúde pública. **TecnoHospital**. (SET /OUT 2013) 22-26.

LU, P.; HO, I.; LEE, T. Induction of sister chromatid exchanges and micronuclei by titanium dioxide in Chinese hamster ovary-K1 cells. **Mutation Research**. 414 (1998) 15-20.

LU, X.; LIU, Y.; KONG, X.; LOBIE, P.E.; CHEN, C.; ZHU, T. - Nanotoxicity: a growing need for study in the endocrine system. **Small**. 9 (2013) 1654-1671.

MA J, LÜ X, HUANG Y. - Genomic analysis of cytotoxicity response to nanosilver in human dermal fibroblasts. **J Biomed Nanotechnol**. 7: 2 (2011) 263-75.

MAGDOLENOVA Z, BILANICOVA D, POJANA G, FJELLSBO LM, HUDECOVA A, HASPLOVA K, MARCOMINI A, DUSINSKA M.- Impact of agglomeration and different dispersions of titanium dioxide nanoparticles on the human related *in vitro* cytotoxicity and genotoxicity. **Journal of Environment Monitoring**. 14 (2012a) 455-464

MAGDOLENOVA Z, COLLINS A, KUMAR A, DHAWAN A, STONE V, DUSINSKA M. - Mechanisms of genotoxicity. A review of *in vitro* and *in vivo* studies with engineered nanoparticles. **Nanotoxicology**. (2013 Mar 20). Early Online, 1–46.

MAGDOLENOVA Z, LORENZO Y, COLLINS A, DUSINSKA M Can Standard Genotoxicity Tests be Applied to Nanoparticles? **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A**. 75 (2012b) 800-806.

MA-HOCK, L.; TREUMANN, S.; STRAUSS, V.; BRILL, S.; LUIZI, F.; MERTLER, M.; WIENCH, K.; GAMER, A.; VAN RAVENZWAAY B. O.; LANDSIEDEL, R. - Inhalation toxicity of multiwall carbon nanotubes in rats exposed for 3 months. **Toxicological Science**. 112 (2009) 468-81.

MALHI, G.S. - The Chronic Toxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles to the Freshwater Amphipod *Hyaella azteca*. MSc Thesis, Wilfrid Laurier University, Wilfrid Laurier University, 2012.

MAURER-JONES, M.A.; HAYNES, C.L. - Toward correlation in *in vivo* and *in vitro* nanotoxicology studies. **Journal of law, medicine & ethics**. 40 (2012) 795-801.

MAYNARD, A. D., P. A. BARON, M. FOLEY, A. A. SHVEDOVA, E. R. KISIN & V. CASTRANOVA - Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A**. 67 (2004) 87-107.

MAYNARD, A. D.; WARHEIT, D. B.; PHILBERT, M. A. - The new toxicology of sophisticated materials: nanotoxicology and beyond. **Toxicological Sciences**. 120:Suppl 1, (2011) S109-29.

MAYNARD, A.; AITKEN, R.; BUTZ, T.; COLVIN, V.; DONALDSON, K.; OBERDÖRSTER, G.; PHILBERT, M.; RYAN, J.; SEATON, A.; STONE, V.; TINKLE, S.; TRAN, L.; WALKER, N.; WARHEIT, D. - Safe handling of nanotechnology. **Nature**. 444 (2006) 267-9.

MIGLIORE, L.; SARACINO, D.; BONELLI, A.; COLOGNATO, R.; D'ERRICO, MR.; MAGRINI, A.; BERGAMASCHI, A.; BERGAMASCHI, E. Carbon nanotubes induce oxidative DNA damage in RAW 264.7 cells. **Environmental Molecular Mutagenesis**. 51 (2010) 294-303.

MITCHELL, L.A.; GAO, J.; WAL, R.V.; GIGLIOTTI, A.; BURCHIEL, S.W., MCDONALD, J.D. - Pulmonary and systemic immune response to inhaled multiwalled carbon nanotubes. **Toxicological Sciences**. 100:1 (2007 Nov) 203-14.

MONTEIRO-RIVIERE, N.A.; WIENCH, K.; LANDSIEDEL, R.; SCHULTE, S.; INMAN, A.O.; RIVIERE, J.E. - Safety evaluation of sunscreen formulations containing titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in UVB sunburned skin: an *in vitro* and *in vivo* study. **Toxicological Sciences**. 123 (2011) 264-280.

MOORE, D.D. - Preparation and analysis of DNA, 1ªedição edn.: Wiley, John & Sons, Incorporated, 1989.

MOSCHINI, E.; GUALTIERI, M.; COLOMBO, M.; FASCIO, U.; CAMATINI, M.; MANTECCA, P. - The modality of cell-particle interactions drives the toxicity of nanosized CuO and TiO₂ in human alveolar epithelial cells. **Toxicology Letters**. 222 (2013) 102-116.

MOUCHET, F.; LANDOIS, P.; SARREMEJEAN, E.; BERNARD, G.; PUECH, P.; PINELLI, E.; FLAHAUT, E.; GAUTHIER, L. - Characterisation and *in vivo* ecotoxicity

evaluation of double-wall carbon nanotubes in larvae of the amphibian *Xenopus laevis*. **Aquatic Toxicology**. 87: 2 (2008 Apr 28) 127-37.

MUELLER, N.C.; NOWACK, B. - Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. **Environmental Science & Technology**. 42 (2008) 4447-4453.

MULLER, J.; DECORDER, I.; HOET, PH.; LOMBAERT, N.; THOMASSEN, L.; HUAUX, F.; LISON, D.; KIRSCH-VOLDERS, M. - Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. **Carcinogenesis**. 29 (2008): 427-433.

MULLER, J.; DELOS, M.; PANIN, N.; RABOLLI, V.; HUAUX, F.; LISON, D. - Absence of carcinogenic response to multiwall carbon nanotubes in a 2-year bioassay in the peritoneal cavity of the rat. **Toxicological Sciences**. 110:2 (2009) 442-448.

MULLER, J.; HUAUX, F.; MOREAU, N.; MISSON, P.; HEILIER, JF.; DELOS, M.; ARRAS, M.; FONSECA, A.; NAGY, JB.; LISON, D. - Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 207 (2005): 221-231.

NAKAGAWA Y, WAKURI S, SAKAMOTO K, TANAKA N. - The photogenotoxicity of titanium dioxide particles. **Mutation Research**. 394: 1-3 (1997) 125-32.

NAM, S.H.; KIM, S.W.; AN, Y.J. - No evidence of the genotoxic potential of gold, silver, zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles in the SOS chromotest. **Journal of Applied Toxicology**. (2012) DOI: 10.1002/jat.2830.

NANOGENOTOX JOINT ACTION - Facilitating the safety evaluation of manufactured nanomaterials by characterising their potential genotoxic hazard: Final publishable report: Paris: French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES), 2013. Disponível em <http://www.NANOGENOTOX.eu>.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES - Applications of Toxicogenomic Technologies to Predictive Toxicology and Risk Assessment (Executive Summary): Committee on Applications of Toxicogenomic Technologies to Predictive Toxicology and Risk, Assessment, National Research Council, 2007. Disponível em <http://www.nap.edu>.

NAYA, M.; KOBAYASHI, N.; EMA, M.; KASAMOTO, S.; FUKUMURO, M.; TAKAMI, S.; NAKAJIMA, M.; HAYASHI, M.; NAKANISHI, J. *In vivo* genotoxicity study of titanium dioxide nanoparticles using comet assay following intratracheal instillation in rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. 62 (2012) 1-6.

NEL, A.; XIA, T.; MENG, H.; WANG, X.; LIN, S.; JI, Z.; ZHANG, H. - Nanomaterial Toxicity Testing in the 21st Century: Use of a Predictive Toxicological Approach and High-Throughput Screening. **Accounts of Chemical Research**. 46:3 (2013 Mar 19) 607-21.

NEŠKOVIĆ, O.; JOKSIĆ, G.; VALENTA-ŠOBOT, A.; CVETIĆANIN, J.; TRPKOV, D.; LESKOVAC, A.; PETROVIĆ, S. Genotoxic assessment of carbon nanotubes. **Methods Molecular Biology**. 991 (2013) 315-23.

NIOSH - NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH - **Current Intelligence Bulletin 63: Occupational Exposure to Titanium Dioxide**. Publication No. 2011–160. Ohio: Centers for Disease Control and Prevention National Institute for Occupational Safety and Health. Department of Health and Human Services, 2011.

NIOSH - NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH. - **Current Intelligence Bulletin 65: Occupational Exposure to Carbon Nanotubes and Nanofibers**. Publication No. 2013–145. Ohio: Centers for Disease Control and Prevention National Institute for Occupational Safety and Health. Department of Health and Human Services, 2013.

NOHYNEK, G.J.; ANTIGNAC, E.; TOUTAIN, H. - Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 243 (2010) 239-259.

OBERDÖRSTER G, OBERDÖRSTER E, OBERDÖRSTER J. - Concepts of nanoparticle dose metric and response metric. **Environmental Health Perspectives**. 115 (2007) A290.

OBERDÖRSTER, G. - Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. **J Intern Med**. 267 (2010) 89-105.

OBERDÖRSTER, G.; OBERDÖRSTER, E.; OBERDÖRSTER, J. - Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environmental Health Perspectives**. 113 (2005) 823-39.

OBERDÖRSTER, G.; SHARP, Z.; ATUDOREI, V.; ELDER, A.; GELEIN, R.; KREYLING, W.; COX, C. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. **Inhalation Toxicology**. 16 (2004) 437-445.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - Guidance on sample preparation and dosimetry for the safety testing of manufactured nanomaterials. In Organisation for Economic Co-operation and Development ED (ed.); 36.; Paris.; Vol. ENV/JM/MONO (2012) 40.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – Series on testing and assessment: Number 103 - Detailed review paper on transgenic rodent mutation assays. Paris: Environment Directorate Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology, 2009.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - Test No. 488: Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**. Section 4: OECD Publishing, 2013. doi: 10.1787/9789264203907-en.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - Test No. 474: OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. OECD Publishing, 1997.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - Test No. 487: OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS - *In vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test. Section 4: Health Effects. OECD Publishing, 2010.

OLMEDO, D.G.; TASAT, D.R.; GUGLIELMOTTI, M.B.; CABRINI, R.L. - Biodistribution of titanium dioxide from biologic compartments. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. 19 (2008) 3049-3056.

OMS – Organização Mundial de Saúde- WHO human health risk assessment toolkit: chemical hazards. IPCS harmonization project document. Ottawa: World Health Organization, 2010.

OOMEN, A.; BENNINK, M.; VAN ENGELEN, J.; SIPS, A. - Nanomaterial in consumer products- Detection, characterisation and interpretation. RIVM Report. National Institute for Public Health and the Environment, 2011.

OSMAN IF, BAUMGARTNER A, CEMELI E, FLETCHER JN, ANDERSON D. Genotoxicity and cytotoxicity of zinc oxide and titanium dioxide in HEP-2 cells. **Nanomedicine**. 2010 Oct;5(8):1193-203

PACURARI, M.; QIAN, Y.; PORTER, DW.; WOLFARTH, M.; WAN, Y.; LUO, D.; DING, M.; CASTRANOVA, V.; GUO, NL. - Multi-walled carbon nanotube-induced gene expression in the mouse lung: association with lung pathology. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 255:1(2011) 18-31.

PACURARI, M.; YIN, XJ.; ZHAO, J.; DING, M.; LEONARD, SS.; SCHWEGLER-BERRY, D.; DUCATMAN, BS.; SBARRA, D.; HOOVER, MD.; CASTRANOVA, V.; VALLYATHAN, V. - Raw single-wall carbon nanotubes induce oxidative stress and activate MAPKs, AP-1, NF-kappaB, and Akt in normal and malignant human mesothelial cells. **Environmental Health Perspectives**. 116 (2008) 1211-1217.

PARK, E.J.; CHO, W.S.; JEONG, J.; YI J.; CHOI, K.; PARK, K. Pro-inflammatory and potential allergic responses resulting from B cell activation in mice treated with multi-walled carbon nanotubes by intratracheal instillation. **Toxicology**. 259 (2009) 113-121.

PARK, M.; LANKVELD, D.; VAN LOVEREN, H., DE JONG WH.- The status of *in vitro* toxicity studies in the risk assessment of nanomaterials. **Nanomedicine**. 4 (2009) 669-685.

PARLAMENTO EUROPEU - Resolução do Parlamento Europeu, de 24 de Abril de 2009, sobre aspectos regulamentares dos nanomateriais (2008/2208(INI)). **Jornal Oficial da União Europeia**. C 184 E/82: 8.7.2010.

PARREIRA, D.B., EUGÉNIO, F. Nanopartículas para aplicação oncológica. In Instituto Nacional da Propriedade Industrial (ed.), 2011. Disponível em: <http://www.marcasepatentes.pt>.

PATLOLLA, A.K.; BERRY, A.; TCHOUNWOU, P.B. - Study of hepatotoxicity and oxidative stress in male Swiss-Webster mice exposed to functionalized multi-walled carbon nanotubes. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 358 (2011) 189-199.

PATLOLLA, A.K.; HUSSAIN, S.M.; SCHLAGER, J.J.; PATLOLLA, S.; TCHOUNWOU, P.B. - Comparative Study of the Clastogenicity of Functionalized and Nonfunctionalized Multiwalled Carbon Nanotubes in Bone Marrow Cells of Swiss-Webster Mice. **Environmental Toxicology**. 25: 6 (2010) 608-621.

PESTANA, M.H., GAGEIRO, J.N. - Análise de Dados para Ciências Sociais- a complementaridade do SPSS. 1ªedição. Lisboa: Edições Sílabo, 1998.

PIETERS, B. J. - Nano SEE: Nano materials industrial Status and Expected Evolution 08. Yole Développement, 2008. [Consulta em 3 de Setembro de 2011]. Disponível em <http://www.sensorsportal.com/HTML/NanoSEE.htm>.

PIETROIUSTI, A. - Health implications of engineered nanomaterials. **Nanoscale** 4 (2012) 1231-1247.

PIETROIUSTI, A.; CAMPAGNOLO, L.; FADEEL, B. -Interactions of engineered nanoparticles with organs protected by internal biological barriers. **Small**. 9 (2013) 1557-1572.

PINTO, M. – Characterization of cytotoxicity and genotoxicity of sediments from a potentially contaminated estuary. MsD. Thesis, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2011.

POLAND, C.A.; DUFFIN, R.; KINLOCH, I.; MAYNARD, A.; WALLACE, W.A.; SEATON, A.; STONE, V.; BROWN, S.; MACNEE, W.; DONALDSON, K. - Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. **Nature Nanotechnology**. 3: 7 (2008 Jul) 423-8.

PORTARIA n.º 1005/92, D.R. Iª Série – B, 245 (23-10-1992) 4930-4942.

RAHMAN, Q.; LOHANI, M.; DOPP, E.; PEMSEL, H.; JONAS, L.; WEISS, D. G.; SCHIFFMANN, D. - Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. **Environmental Health Perspectives**. 110 (2002) 797-800.

RAMANAKUMAR, A.V.; PARENT, M.E.; LATREILLE, B.; SIEMIATYCKI, J. - Risk of lung cancer following exposure to carbon black, titanium dioxide and talc: results from two case-control studies in Montreal. **International Journal of Cancer**.122:1 (2008 Jan) 183-9.

REHN, B.; SEILER, F.; REHN, S.; BRUCH, J.; MAIER, M. - Investigations on the inflammatory and genotoxic lung effects of two types of titanium dioxide: untreated and surface treated. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 189 (2003) 84-95.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J.L. - Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**. 3 (2008) 1125-1131.

RIVIERE, J.E. - Pharmacokinetics of nanomaterials: an overview of carbon nanotubes, fullerenes and quantum dots. **Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology**. 1 (2009) 26-34.

ROBICHAUD, C.O.; UYAR, A.E.; DARBY, M.R.; ZUCKER, L.G.; WIESNER, M.R. - Estimates of upper bounds and trends in nano-TiO₂ production as a basis for exposure assessment. **Environmental Science & Technology**. 43 (2009) 4227-4233.

ROCO, M., C. A. MIRKIN & M. C. HERSAM. - Nanotechnology Research Directions for societal needs in 2020. World Technology Evaluation Center Panel Report. Springer, 2010.

ROSZAK, J.; STEPNIK, M.; NOCUN, M.; FERLINSKA, M.; SMOK-PIENIAZEK, A.; GROBELNY, J.; TOMASZEWSKA, E.; WASOWICZ, W.; CIESLAK, M. - A strategy for *in vitro* safety testing of nanotitania-modified textile products. **Journal of Hazardous Materials**. 256-257 (2013) 67-75.

RÜTHER, U.; MÜLLER-HILL, B. - Easy identification of cDNA clones. **EMBO Journal**. 2: (1983) 1791-1794.

SADIQ, R.; BHALLI, JA.; YAN, J.; WOODRUFF, RS.; PEARCE, M.G.; LI, Y.; MUSTAFA, T.; WATANABE, F.; PACK, L.M.; BIRIS, A.S.; KHAN, Q.M.; CHEN, T. - Genotoxicity of TiO₂ anatase nanoparticles in B6C3F1 male mice evaluated using Pig-a and flow cytometric micronucleus assays. **Mutation Research**. 745 (2012): 65-72.

SAQUIB, Q.; AL-KHEDHAIRY, A.A.; SIDDIQUI, M.A.; ABOU-TARBOUSH, F.M.; AZAM, A.; MUSARRAT, J. - Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. **Toxicology in vitro**. 26 (2012) 351-361.

SAVOLAINEN, K.; BACKMAN, U.; BROUWER, D.; FADEEL, B.; FERNANDES, T.; KUHLEBUSCH, T.; LANDSIEDEL, R.; LYNCH, I.; PYLKKÄNEN, L. - Nanosafety in Europe 2015-2025: Towards Safe and Sustainable Nanomaterials and Nanotechnology Innovation. 2013. Helsinki: Finnish Institute of Occupational Health.

SCCP - SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER PRODUCTS - Opinion on Safety of nanomaterials in cosmetic products. SCCP/1147/07(18 December 2007). Health and Consumer Protection DG Directorate C: Public Health and Risk Assessment, Brussels.

SCCS - SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER SAFETY – OPINION ON Titanium Dioxide (nano form) COLIPA n° S75: Luxembourg, 2013.

SCCS - SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER SAFETY – Opinion on Zinc oxide (nano form) COLIPA n° S76: Luxembourg, 2012.

SCENIHR - SCIENTIFIC COMMITTEE ON EMERGING AND NEWLY IDENTIFIED HEALTH RISKS. - Risk assessment methodologies and approaches for genotoxic and carcinogenic substances. Brussels: European Commission, 2009a. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/archive/ph_risk/committees/04_scher/docs/scher_o_113.pdf

SCENIHR - SCIENTIFIC COMMITTEE ON EMERGING AND NEWLY IDENTIFIED HEALTH RISKS. - Risk Assessment of Products of Nanotechnologies. Brussels: European Commission, 2009b.. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/archive/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_023.pdf

SCENIHR - SCIENTIFIC COMMITTEE ON EMERGING AND NEWLY IDENTIFIED HEALTH RISKS. -The Scientific Basis for the Definition of the Term “nanomaterial”. Brussels: European Commission, 2010. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihhr_o_032.pdf.

SCHNEIDER, T. - Evaluation and control of occupational health risks from nanoparticles. **TemaNord**. 581 (2007). Disponível em: www.norden.org/publications.

SCHILLING, K.; BRADFORD, B.; CASTELLI, D.; DUFOUR, E.; NASH, J. F.; PAPE, W.; SCHULTE, S.; TOOLEY, I.; VAN DEN BOSCH, J.; SCHELLAUF, F. - Human safety review of "nano" titanium dioxide and zinc oxide. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 9 (2010) 495-509.

SETYAWATI, M.I.; KHOO, P.K.; ENG, B.H.; XIONG, S.; ZHAO, X.; DAS, G.K.; TAN, T.T.; LOO, J.S.; LEONG, D.T.; NG, K.W. - Cytotoxic and genotoxic characterization of titanium dioxide, gadolinium oxide, and poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles in human fibroblasts. **J Biomed Mater Res A**.101:3 (2013 Mar) 633-40.

SHARMA V.; ANDERSON D.; DHAWAN A Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). **Apoptosis** 17 (2012a): 852-870.

SHARMA, V.; SINGH, P.; PANDEY, A.K.; DHAWAN, A.- Induction of oxidative stress, DNA damage and apoptosis in mouse liver after sub-acute oral exposure to zinc oxide nanoparticles. **Mutation Research**. 745: (2012b) 84-91.

SHARMA, V.; SINGH, SK.; ANDERSON, D.; TOBIN, D.J.; DHAWAN, A. - Zinc oxide nanoparticle induced genotoxicity in primary human epidermal keratinocytes. **J Nanosci Nanotechnol**. 2011; 11(5):3782-8.

SHUKLA, R.K.; SHARMA, V.; PANDEY, A.K.; SINGH, S.; SULTANA, S.; DHAWAN, A. - ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. **Toxicology In vitro**. 25 (2010) 231-241.

SIMKÓ, M. - Why is the (nano-)dose question so important? NanoTrust-Dossier: Institute of Technology Assessment of the Austrian Academy of Sciences: Vienna, 2012.

SIMON-DECKERS, A.; GOUGET, B.; MAYNE-L'HERMITE, M.; HERLIN-BOIME, N.; REYNAUD, C.; CARRIERE, M. - *In vitro* investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. **Toxicology**. 253 (2008) 137-146.

SINGH, C.; FRIEDRICH, S.; LEVIN, M.; BIRKED, L. R.; JENSEN, K.A.; POJANA, G.; WOHLLEBEN, W.; SCHULTE, S.; WIENCH, K.; TURNEY, T.; KOULAEVA, O.; MARSHALL, D.; HUND-RINKE, K.; KÖRDEL, W.; VAN DOREN, E.; DE TEMMERMAN, P.-J.; FRANCISCO, M.; MAST, J.; GIBSON, J.; KOEBER, N.R.; LINSINGER, T.; KLEIN, CL - Zinc Oxide NM-110, NM-111, NM-112, NM-113 Characterisation and Test Item Preparation. In Joint Research Centre: NM-Series of Representative Manufactured Nanomaterials Luxembourg, 2011.

SINGH, N.; MANSHIAN, B.; JENKINS, G. J.; GRIFFITHS, S. M.; WILLIAMS, P. M.; MAFFEIS, T. G.; WRIGHT, C. J.; DOAK, S. H. - NANOGENOTOXICology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. **Biomaterials**. 30 (2009) 3891-914.

SOM, C.; BERGES, M.; CHAUDHRY, Q.; DUSINSKA, M.; FERNANDES, T. F.; OLSEN, S. I.; NOWACK, B. - The importance of life cycle concepts for the development of safe nanoproducts. **Toxicology**. 269 (2010) 160-9.

SOUZA UVA, A. – **Diagnóstico e gestão do risco em saúde ocupacional**. 2ªed. Lisboa: ACT, 2010.

SRIVASTAVA, R.K.; RAHMAN, Q.; KASHYAP, M.P.; SINGH, A.K.; JAIN, G.; JAHAN, S.; LOHANI, M.; LANTOW, M.; PANT, A.B. Nano-titanium dioxide induces genotoxicity and apoptosis in human lung cancer cell line, A549. **Human & Experimental Toxicology**. 32 (2013) 153-166.

STEARNS, R.C.; PAULAUSKIS, J.D.; GODLESKI, J.J. Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. 24 (2001) 108-115.

STONE, V.; JOHNSTON, H.; SCHINS, R.P. Development of *in vitro* systems for nanotoxicology: methodological considerations. **Critical Reviews in Toxicology**. 39 (2009): 613-626.

SYCHEVA, L. P.; ZHURKOV, V. S.; IURCHENKO, V. V.; DAUGEL-DAUGE, N. O.; KOVALENKO, M. A.; KRIVTSOVA, E. K.; DURNEV, A. D. - Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of micro- and nanosized titanium dioxide in six organs of mice *in vivo*. **Mutation Research**. 726 (2011) 8– 14.

SYCHEVA, L. P.; ZHURKOV, V. S.; IURCHENKO, V. V.; DAUGEL-DAUGE, N. O.; KOVALENKO, M. A.; KRIVTSOVA, E. K.; DURNEV, A. D. - Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of micro- and nanosized titanium dioxide in six organs of mice *in vivo*. **Mutation Research**. 726 (2011) 8–14.

SZENDI, K.; VARGA, C. - Lack of genotoxicity of carbon nanotubes in a pilot study. **Anticancer Research**. 28 (2008) 349-52.

TABET, L.; BUSSY, C.; AMARA, N.; SETYAN, A.; GRODET, A.; ROSSI, M.J.; PAIRON, J.C.; BOCZKOWSKI, J.; LANONE, S. - Adverse effects of industrial multiwalled carbon nanotubes on human pulmonary cells. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A**. 72 (2009) 60-73.

TAKAGI, A.; HIROSE, A.; NISHIMURA, T.; FUKUMORI, N.; OGATA, A.; OHASHI, N.; KITAJIMA, S.; KANNO, J. - Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. **The Journal of Toxicological Sciences**. 33:1 (2008 Feb) 105-16.

TAVARES, A.; LOURO, H.; ANTUNES, S.; QUARRE, S.; SIMAR, S.; DE TEMMERMAN, P-J.; VERLEYSSEN, E.; MAST, J.; JENSEN, K.A.; NORPPA, H.; NESSLANY, F.; SILVA, M.J. - Genotoxicity evaluation of nanosized titanium dioxide,

synthetic amorphous silica and multi-walled carbon nanotubes in human lymphocytes. **Toxicology In vitro**. (2013). *In press*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2013.06.009>.

TGA - THERAPEUTIC GOODS ADMINISTRATION. - A review of the scientific literature on the safety of nanoparticulate titanium dioxide or zinc oxide in sunscreens. Department of Health and Ageing: Australian Government, 2013.

THE ROYAL SOCIETY & THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING - Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. 2004. Disponível em: <http://www.occup-med.com/content/pdf/1745-6673-6-7.pdf>.

TICE, R., E. AGURELL, D. ANDERSON, B. BURLINSON, A. HARTMANN, H. KOBAYASHI, Y. MIYAMAE, E. ROJAS, J. RYU & Y. SASAKI. - Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 35 (2000) 206-21.

TOYOOKA, T.; AMANO, T.; IBUKI, Y. - Titanium dioxide particles phosphorylate histone H2AX independent of ROS production. *Mutation Research*. 742 (2012) 84-91.

TROUILLER, B.; RELIENE, R.; WESTBROOK, A.; SOLAIMANI, P.; SCHIESTL, R. H. - Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability *in vivo* in mice. **Cancer Research**. 69 (2009) 8784-9.

TSAI, S.J.; HOFMANN, M.; HALLOCK, M.; ADA, E.; KONG, J.; ELLENBECKER, M. - Characterization and evaluation of nanoparticle release during the synthesis of single-walled and multiwalled carbon nanotubes by chemical vapor deposition. **Environmental Science & Technology**. 43 (2009) 6017-6023.

TÜRKEZ, H.; GEYIKOGLU, F. - An *in vitro* blood culture for evaluating the genotoxicity of titanium dioxide: the responses of antioxidant enzymes. **Toxicology and Industrial Health**. 23 (2007) 19-23.

UMBREIT, T.H.; FRANCKE-CARROLL, S.; WEAVER, J.L.; MILLER, T.J.; GOERING, P.L.; SADRIEH, N.; STRATMEYER, M.E. - Tissue distribution and histopathological effects of titanium dioxide nanoparticles after intravenous or subcutaneous injection in mice. **Journal of Applied Toxicology**. 32 (2012) URSINI, C.L.; CAVALLO, D.; FRESEGNA, A.M.; CIERVO, A.; MAIELLO, R.; BURESTI, G.; CASCIARDI, S.; TOMBOLINI, F.; BELLUCCI, S.; IAVICOLI, S. -Comparative cyto-genotoxicity

assessment of functionalized and pristine multiwalled carbon nanotubes on human lung epithelial cells. **Toxicology In vitro**. 26 (2012) 831-840

VALDIGLESIAS, V.; COSTA, C.; KILIC, G.; COSTA, S.; PASARO, E.; LAFFON, B.; TEIXEIRA, J.P. Neuronal cytotoxicity and genotoxicity induced by zinc oxide nanoparticles. **Environment International**. 55 (2013) 92-100.

VALENTIN-SEVERIN, I.; LE HEGARAT, L.; LHUGUENOT, JC.; LE BON, A.M.; CHAGNON, M.C. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutation Research**. 536 (2003) 79-90.

VAN BENTHEM, J. - The effect of REACH implementation on genotoxicity and carcinogenicity testing. RIVM report 601200008, 2007. [Consulta em 7 de Setembro de 2011]. Disponível em: <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/601200008.pdf>.

VAN HUMMELEN, P.; KIRSCH-VOLDERS, M. - An improved method for the 'in vitro' micronucleus test using human lymphocytes. **Mutagenesis**. 5: 2 (1990 Mar) 203-4.

VIRAG, L.; SZABO, C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. **Pharmacological Reviews**. 54 (2002) 375-429.

WAMER, W.G.; YIN, J.J.; WEI, R.R. - Oxidative damage to nucleic acids photosensitized by titanium dioxide. **Free Radical Biology & Medicine**. 23 (1997) 851-858.

WANG J.; ZHOU G.; CHEN C.; YU H.; WANG T.; MA Y.; JIA G.; GAO Y.; LI B.; SUN J.; LI Y.; JIAO F.; ZHAO Y.; CHAI Z (2007b) Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. **Toxicology Letters**. 168: 176-185

WANG, J.; SANDERSON, B.; WANG, H (2007a) Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells. **Mutation Research**. 628: 99-106

WANG, S.; HUNTER, L. A.; ARSLAN, Z. M.; WILKERSON, G.; WICKLIFFE, J. K. - Chronic exposure to nanosized, anatase titanium dioxide is not cyto- or genotoxic to Chinese hamster ovary cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 52 (2011) 614-22.

WARHEIT, D. B.; DONNER, E. M. - Rationale of genotoxicity testing of nanomaterials: regulatory requirements and appropriateness of available OECD test guidelines. **Nanotoxicology** 4 (2010) 409-13.

WARSHAW, J. - The Trend Towards Implementing the Precautionary Principle in us Regulation of Nanomaterials. **Dose Response**. 10 (2012) 384-396.

WIJNHOF, S. W. P.; DEKKERS, S.; KOOI, M.; JONGENEEL, W. P.; DE JONG, W. H. - Nanomaterials in consumer products- Update of products on the European market in 2010. Bilthoven: RIVM Report 340370003/2010, 2010.

WIRNITZER, U.; HERBOLD, B.; VOETZ, M.; RAGOT, J. - Studies on the *in vitro* genotoxicity of baytubes.; agglomerates of engineered multi-walled carbon-nanotubes (MWCNT). **Toxicology Letters**. 186 (2009) 160-165.

WOODRUFF, R.S.; LI, Y.; YAN, J.; BISHOP, M.; JONES, M.Y.; WATANABE, F.; BIRIS, A.S.; RICE, P.; ZHOU, T.; CHEN, T. - Genotoxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles using the Ames test and Comet assay. **Journal of Applied Toxicology**. 32:11 (Nov 2012) 934-43.

XIA, T.; HAMILTON, R.F.; BONNER, J.C.; CRANDALL, E.D.; ELDER, A.; FAZLOLLAHI, F.; GIRTSMAN, T.A.; KIM, K.; MITRA, S.; NTIM, S.A.; ORR, G.; TAGMOUNT, M.; TAYLOR, A.J.; TELESKA, D.; TOLIC, A.; VULPE, C.D.; WALKER, A.J.; WANG, X.; WITZMANN, F.A.; WU, N.; XIE, Y.; ZINK, J.I.; NEL, A.; HOLIAN, A. - Interlaboratory Evaluation of *in vitro* Cytotoxicity and Inflammatory Responses to Engineered Nanomaterials: The NIEHS Nano GO Consortium. **Environmental Health Perspectives**. 121 (2013) 683-690.

XIONG, S.; GEORGE, S.; YU, H.; DAMOISEAUX, R.; FRANCE, B.; NG, K.W.; LOO, J.S. -Size influences the cytotoxicity of poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. **Archives of Toxicology**. 87 (2013) 1075-1086.

XU, A.; CHAI, Y.; NOHMI, T.; HEI, T.K. - Genotoxic responses to titanium dioxide nanoparticles and fullerene in gpt delta transgenic MEF cells. **Particle and Fibre Toxicology**. 6 (2009) 3.

YE, S.F.; WU, Y.H.; HOU, Z.Q.; ZHANG, Q.Q. - ROS and NF-kappaB are involved in upregulation of IL-8 in A549 cells exposed to multi-walled carbon nanotubes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 379 (2009) 643-648.

YOKEL, R. A.; MACPHAIL, R. C. - Engineered nanomaterials: exposures, hazards, and risk prevention. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 6:7 (2011). Disponível em: <http://www.occup-med.com/content/pdf/1745-6673-6-7.pdf>.

ZHU M.; NIE G.; MENG H.; XIA T.; NEL A.; ZHAO Y (2012) Physicochemical Properties Determine Nanomaterial Cellular Uptake.; Transport.; and Fate. **Accounts of Chemical Research**. 46:3 (2013 Mar 19) 622-31.

ZHU, L, CHANG DW, DAI L, HONG Y. - DNA damage induced by multiwalled carbon nanotubes in mouse embryonic stem cells. **Nano Letters**.7:12 (2007 Dec) 3592-7.

APÊNDICES

APÊNDICE I. TABELAS DE RESULTADOS DOS ENSAIOS EM LINFÓCITOS

As tabelas seguintes apresentam os valores detalhados das frequências de células binucleadas micronucleadas (CBMN) e mononucleadas micronucleadas (CMMN), bem como os valores dos índices proliferativos (CBPI) e replicativos (RI) em linfócitos humanos expostos aos NMs.

TABELA A1.1. Frequências de linfócitos binucleados com micronúcleo (CBMN) após exposição a NMs.

TiO₂	Média de CBMN/1000 CB (média±DP)			
Concentração (µg/ml)	NM-102	NM-103	NM-104	NM-105
0	9,17±1,53	7,33±2,25	4,76±1,75	5,83±2,84
5	12,67±1,89	12,33*±5,20	6,33±1,26	7,83±3,75
15	12,50±1,50	8,83±2,84	7,83*±4,37	8,00±1,32
45	11,25±1,06	11,50*±5,66	8,00*±3,54	7,50±2,83
125	13,33*±4,75	6,50 ±2,78	6,17±3,51	7,67±2,52
250	8,17±1,26	5,33±2,08	4,17±1,76	7,00±1,00
MMC 0.167 µg/ml	27,75*±24,4	25,67*±10,2	37,17*±12,21	30,67*±4,16
NTCs	Média de CBMN/1000 CB (média±DP)			
Concentração (µg/ml)	NM-402	NM-403	NRCWE-006	NRCWE-007
0	10,25±1,06	10,00±1,41	5,50±1,41	6,00±0,71
2,5	10,25±0,35	19,25*±0,35	11,25*±0,35	6,00±0,71
5	11,50±2,12	16,75*±4,60	7,25±1,77	3,75±0,35
15	16,75*±10,25	18,50*±0,71	3,75±1,77	3,75±1,77
45	8,25±0,35	23,50*±10,61	9,25±1,77	6,25±0,35
60	-	-	-	8,50±3,54
100	-	-	-	4,50±0,71
125	9,50±2,12	14,50±4,95	9,00±0,71	4,50±0,71
250	13,00±0,00	16,25*±5,30	5,25±1,06	4,00
MMC 0,167 µg/ml	40,00*±5,66	38,5*±0,71	25,00*±5,66	25,5*±2,12

0- Controlo negativo; MMC –mitomicina C (controlo positivo); DP- desvio padrão;

*Significativamente superior aos controlos negativos ($p < 0,05$; teste exato de Fisher).

Relativamente às células mononucleadas micronucleadas, as tabelas seguintes apresentam as observações efectuadas.

TABELA A1.2. Frequências de células Mononucleadas (CM) com micronúcleo (CMMN) em linfócitos humanos expostos a NMs.

TiO₂		Média de CMMN/1000 CM (média±DP)			
Concentração (µg/ml)		NM-102	NM-103	NM-104	NM-105
0		3,00±1,41	2,00±2,83	3,00±4,24	2,00±2,83
5		3,00±1,41	6,00±0,00	2,00±0,00	3,00±1,41
15		0,00±0,00	2,00±2,83	1,00±1,41	1,00±1,41
45		2,00±0,00	12,00*±0,00	0,00±0,00	2,00±2,83
125		2,00± 0,00	5,00±1,41	1,00±1,41	1,00±1,41
250		6,00±2,83	1,00±1,41	6,00±0,00	2,00±0,00
MMC 0,167 µg/ml		1,00	4,00±2,83	2,50±2,12	3,00±2,83
NTCs		Média de CMMN/1000 CM (média±DP)			
Concentração (µg/ml)		NM-402	NM-403	NRCWE-006	NRCWE-007
0		3,00±4,24	7,00±7,07	1,00±1,41	0,00±0,00
2,5		2,00±0,00	9,00±4,24	0,00±0,00	4,00±2,83
5		7,00±1,41	9,00±1,41	1,00±1,41	1,00±1,42
15		4,00±2,83	7,00±1,41	0,00±0,00	2,00±2,83
45		6,00±2,83	9,00±4,24	1,00±1,41	0,00±0,00
60		-	-	-	2,00±2,83
100		-	-	-	4,00±5,66
125		5,00±1,41	13,00±4,24	0,00±0,00	5,00±4,24
250		3,00±1,41	9,00±1,41	1,00±1,41	0,00
MMC 0,167 µg/ml		1,00±0,00	5,50±2,12	0,50±0,71	0,50±0,71

0- Controlo negativo; MMC –mitomicina C (controlo positivo); dp- desvio padrão; * Significativamente superior aos controlos negativos (p < 0,05; Teste exato de Fisher).

Por último, apresentam-se as tabelas relativas às determinações da proliferação celular no decurso do ensaio do micronúcleo, em linfócitos expostos a NMs.

TABELA A1.3. Determinação da interferência dos NMs com a proliferação celular em linfócitos humanos, através do índice de bloqueio da citocinese, CBPI.

TiO₂	CBPI (média±DP)			
Concentração				
(µg/ml)	NM-102	NM-103	NM-104	NM-105
0	2,09±0,06	2,36±0,03	2,35±0,1	2,05±0,26
5	2,04±0,03	2,13±0,11	2,27±0,02	2,10±0,3
15	2,11±0,04	2,23±0,04	2,23±0,11	2,10±0,38
45	2,15±0,04	1,91±0,37	2,31±0,12	2,37±0,17
125	2,21±0,13	2,14±0,26	2,25±0,09	2,12±0,31
250	2,12±0,05	2,22±0,02	2,35±0,02	2,11±0,34
MMC 0,167 µg/ml	1,83*±0,09	1,80*±0,06	1,94*±0,07	1,67±0,22

NTCs	CBPI (média±dp)			
Concentração				
(µg/ml)	NM-402	NM-403	NRCWE-006	NRCWE-007
0	2,19±0,11	2,11±0,09	2,18±0,04	2,36±0,04
2,5	2,10±0,01	2,09±0,07	2,12±0,02	2,24±0,01
5	2,12±0,07	1,93±0,11	2,10±0,03	2,19±0,03
15	1,82±0,3	2,10±0,08	2,03±0,06	2,23±0,13
45	2,05±0,1	1,83±0,32	2,03±0,02	2,24±0,01
60	-	-	-	2,15±0,06
100	-	-	-	2,11±0,02
125	1,95±0,02	NA	2,09±0,06	2,13
250	1,94±0,03	NA	2,05±0,04	2,13
MMC 0,167 µg/ml	1,75*±0,02	1,61*±0,03	1,75*±0,04	1,87*±0,00

0- Controlo negativo; MMC –mitomicina C (controlo positivo); DP- desvio padrão; * Significativamente inferior aos controlos (P< 0,05; teste t-Student); NA- não analisável.

TABELA A1.4. Determinação da interferência dos NMs com a proliferação celular em linfócitos humanos, através do índice replicativo, RI.

TiO₂		RI (média±DP)			
Concentração (µg/ml)	NM-102	NM-103	NM-104	NM-105	
0	100±0	0±0	0±0	0±0	
5	95,24±2,76	83,32±9,25	92,79±8,38	104,63±7,94	
15	101,88±2,5	90,72±4,86	89,86±10,17	103,15±14,53	
45	108,24±3,98	66,34±27,02	92,17±10,4	114,42±14,2	
125	111,14±13,29	84,09±19,55	91,18±3,72	106,54±7,74	
250	102,42±1,03	89,95±1,81	98,73±8,93	104,61±7,57	
MMC 0,167 µg/ml	75±3,06	58,48±3,31	68,76±3,5	62,99±9,58	

NTCs		RI (média±DP)			
Concentração (µg/ml)	NM-402	NM-403	NRCWE-006	NRCWE-007	
0	100±0	100±0	100±0	100±0	
2,5	92,56±1,01	98,78±6,47	94,42±1,62	90,78±0,96	
5	93,51±6,03	84,49±10,28	92,82±2,28	87,36±2,27	
15	68,49±24,88	99,13±6,96	87,18±4,96	90,35±9,44	
45	88,29±8,21	74,74±28,59	87,52±1,69	90,89*±0,54	
60	-	-	-	84,24±4,55	
100	-	-	-	81,92±1,83	
125	79,58±1,28	NA	92,7±5,19	82,8±0,31	
250	78,51±2,4	NA	88,9±3,08	97,91	
MMC 0,167 µg/ml	62,66*±1,39	54,89*±2,3	63,67*±3,62	64,08*±0,29	

0- Controlo negativo; MMC –mitomicina C (controlo positivo); dp- desvio padrão; *

Significativamente diferente dos controlos (P<0,05; análise ANOVA unilateral); NA- não analisável.

A Tabela A1.5. corresponde à conversão das unidades métricas utilizadas anteriormente em concentrações em cm²/ml, conforme explicado na discussão de resultados.

Tabela A1.5. Conversão das concentrações em massa a que foram expostos os linfócitos em concentração utilizando a área superficial.

	Área Superficial Específica (m²/g)*	Concentração (µg/ml)	Concentração (cm²/ml)
NM102	78	0	0,0
		5	3,9
		15	11,7
		45	35,1
		125	97,5
		250	195,0
NM103	51	0	0,0
		5	2,6
		15	7,7
		45	23,0
		125	63,8
		250	127,5
NM104	56	0	0,0
		5	2,8
		15	8,4
		45	25,2
		125	70,0
		250	140,0
NM105	46	0	0,0
		5	2,3
		15	6,9
		45	20,7
		125	57,5
		250	115,0
NM402	226	0	0,0
		2,5	5,7
		5	11,3
		15	33,9
		45	101,7
		125	282,5
NM403	135	250	565,0
		0	0,0
		2,5	3,4
		5	6,8
		15	20,3
		45	60,8
NRCWE-006	26	125	168,8
		250	337,5
		0	0,0
		2,5	0,7
		5	1,3
		15	3,9
		45	11,7

		125	32,5
		250	65,0
NRCWE-007	96	0	0,0
		2,5	2,4
		5,0	4,8
		15	14,4
		45	43,2
		60	57,6
		100	96,0
		125	120,0
		250	240,0
NM-110	13	0	0,0
		16	2,1
		32	4,2
		50	6,5
		64	8,3
		128	16,6
		250	32,5

* De acordo com NANOGENOTOX, 2013.

APÊNDICE II. TABELAS DE RESULTADOS DOS ENSAIOS EM BEAS-2B

Na Tabela A2.1. descrevem-se os resultados do ensaio de viabilidade em células BEAS-2B apresentados nos resultados.

TABELA A2.1. Resultados do ensaio de viabilidade por incorporação do azul de tripano em células BEAS-2B.

	Concentração (µg/ml)	Células Viáveis em comparação com o controle (%) (média±DP)
Controlo Negativo	0	NA
NM-102	64	102,7±34,1
	128	42,3±38,7
	256	59,1±7,9
NM-403	64	63,9±41,7
	128	97,9±14,7
	256	122,5±41,2
NM-110	1,5	97,7±11,6
	4,5	95,6±31,6
	6,0	101,8±33,2
	7,5	9,9*±4,6

0- Controlo negativo; DP- desvio padrão; * Significativamente diferente dos controlos ($p < 0,05$; teste Mann-Whitney).

Por sua vez, as tabelas seguintes apresentam os valores detalhados das frequências de células binucleadas micronucleadas (CBMN), os valores dos índices proliferativos (CBPI) e replicativos (RI) e de DNA na cauda em células BEAS-2B expostas aos NMs.

TABELA A2.2. Frequências de células binucleadas (CB) micronucleadas (CBMN), índice de bloqueio da citocinese (CBPI), índice replicativo (RI), DNA na cauda e momento da cauda *olive* (OTM) em células BEAS-2B expostas a NMs.

NM-102		Ensaio do Micronúcleo (média±DP)		Ensaio do Cometa (média±DP)	
Concentração	CBMN/1000	CBPI	RI	DNA na cauda	OTM
(µg/ml)	CB			(%)	
0	12,25±2,22	2,23±0,07	100,00	1,77±1,73	0,24±0,28
64	5,25*±3,40	2,2±0,04	93,94*±3,06	5,24**±1,27	0,71**±0,35
128	5,50*±3,42	2,2±0,05	93,81±4,06	6,13±3,41	0,75**±0,35
256	5,00*±2,16	2,15±0,06	90,13*±4,6	5,81**±3,05	0,63**±0,33
MMC 0,15 µg/ml	85,25*±15	1,26*±0,07	20,4*±5,33	-	-
EMS 0,50 mM	-	-	-	5,51**±1,46	0,65±0,17
EMS 0,75 mM	-	-	-	8,47**±1,73	1,07**±0,22
NM-403		Ensaio do Micronúcleo (média±DP)		Ensaio do Cometa (média±DP)	
Concentração	CBMN/1000	CBPI	RI	DNA na cauda	OTM
(µg/ml)	CB			(%)	
0	12,25±2,22	2,23±0,07	100,00	1,77±1,73	0,24±0,28
64	6,75*±3,50	2,33±0,06	104,19±4,47	3,58**±1,88	0,52±0,3
128	10,75±6,99	2,31±0,11	102,70±8,31	2,45±0,73	0,32±0,11
256	8,00±4,97	2,35±0,10	105,52±8,16	2,92**±1,44	0,43±0,23
MMC 0,15 µg/ml	85,25*±15	1,26*±0,07	20,4*±5,33	-	-
EMS 0,50 mM	-	-	-	5,51**±1,46	0,65±0,17
EMS 0,75 mM	-	-	-	8,47**±1,73	1,07**±0,22
NM-110		Ensaio do Micronúcleo (média±DP)		Ensaio do Cometa (média±DP)	
Concentração	CBMN/1000	CBPI	RI	DNA na cauda	OTM
(µg/ml)	CB			(%)	
0	12,25±2,22	2,23±0,07	100,00	1,77±1,73	0,24±0,28
1,5	12,5±1,73	2,24±0,03	96,9±2,58	1,84±1,18	0,24±0,19
4,5	10,5±2,38	2,22±0,03	95,8*±2,4	1,58±1,32	0,2±0,19
7,5	NA	1,10*±0,03	7,94*±2,07	45,96**±16,03	10,64**±4,94
MMC 0,15 µg/ml	85,25*±15	1,26*±0,07	20,4*±5,33	-	-
EMS 0,50 mM	-	-	-	5,51**±1,46	0,65±0,17
EMS 0,75 mM	-	-	-	8,47**±1,73	1,07**±0,22

0- Controlo negativo; MMC –mitomicina C; EMS- etilmetanosulfonato (controlos positivos); DP- desvio padrão; * Significativamente diferente do controlo ($p < 0,05$, teste exato de Fisher, ou teste de Kruskal-Wallis no caso do CBPI e RI); ** Significativamente diferente do controlo ($p < 0,05$, teste ANOVA a um factor).

APÊNDICE III. TABELAS DE RESULTADOS DOS ENSAIOS EM A549

Na Tabela A3.1. descrevem-se os resultados do ensaio de viabilidade em células A549.

TABELA A3.1. Ensaio clonogénico para determinação de viabilidade celular em A549.

Ensaio clonogénico (média±DP)			
Concentração NM-102 (µg/ml)	Eficiência de Clonagem	Fração Sobrevivente	Citotoxicidade (%)
0	72,0±3,39	1,0±0	0±0
5	66,0±8,49	0,92±0,12	8,33±11,79
16	60,8±15,84	0,84±0,22	15,56±22
32	52,4±17,54	0,73±0,24	27,22±24,36
64	83,2±10,18	1,16±0,14	-15,56±14,14
128	69,2±2,83	0,96±0,04	3,89±3,93
256	64±0	0,89±0	11,11±0
Concentração NM-402 (µg/ml)	Eficiência de Clonagem	Fração Sobrevivente	Citotoxicidade (%)
0	62,67±6,6	1,00±0,11	0,00±10,53
2,5	61,00±16,5	0,97±0,26	2,66±26,33
5	63,33±0,94	1,01±0,02	-1,06±1,5
15	61,33±0,94	0,98±0,02	2,13±1,50
45	61,67±8,01	0,98±0,13	1,60±12,79
60	71,33±2,83	1,14±0,05	-13,83±4,51
125	23,33±3,77	0,37±0,06	62,77±6,02
250	3,00±0,47	0,05±0,01	95,21±0,75
MMC 0,100 µg/ml	8,33±0,47	0,13±0,01	86,7±0,75
Concentração NM-403 (µg/ml)	Eficiência de Clonagem	Fração Sobrevivente	Citotoxicidade (%)
0	58,00±5,66	1,00±0,1	0,00±9,75
2,5	59,33±0,94	1,02±0,02	-2,3±1,63
5	50,67±3,77	0,87±0,07	12,64±6,5
15	56,33±4,24	0,97±0,07	2,87±7,31
45	58,00±11,31	1,00±0,2	0,00±19,51
60	33,00±5,19	0,57±0,09	43,1±8,94
125	31,00±6,13	0,53±0,11	46,55±10,57

250	11,67±3,3	0,20±0,06	79,89±5,69
MMC 0,100 µg/ml	6,67±4,71	0,11±0,08	88,51±8,13

0- Controlo negativo; MMC –mitomicina C (controlo positivo). DP-desvio padrão.

A Tabela A3.2. resume os resultados do ensaio do micronúcleo em células A549.

TABELA A3.2. Frequências de células binucleadas (CB) micronucleadas (CBMN), índice de bloqueio da citocinese (CBPI), índice replicativo (RI) em células A549 expostas a NMs.

Ensaio do Micronúcleo (média±DP)			
Concentração de NM-102 (µg/ml)	CBMN/1000 CB	CBPI	RI (%)
0	6,00±4,24	1,93±0,02	100
5	8,50±0,71	1,91±0,06	97,79±6,65
16	5,50±0,71	1,92±0,03	98,88±2,70
32	3,50±2,12	1,93±0,01	99,21±1,26
64	6,00±1,41	1,97±0,04	103,64±3,80
128	10,50±2,12	2,00±0,03	106,65±3,12
256	8,00±1,41	2,00±0,02	107,11±2,46
MMC 0,100 µg/ml	69,34*±40,08	1,47**±0,02	50,04**±2,29
Concentração de NM-402 (µg/ml)	CBMN/1000 CB	CBPI	RI(%)
0	10,50±9,19	2,03±0,09	100±0
2,5	5,00±2,83	1,90±0,09	87,00±8,55
5	7,50±0,71	2,02±0,01	99,09±0,78
15	8,50±2,12	1,95±0,05	92,20±4,94
45	15,50±7,78	2,01±0,04	97,93±4,04
60	12,00*±4,24	1,99±0,12	96,18±11,5
125	22,00*±1,41	2,00±0,04	96,81±3,81
250	20, 00±1,41	2,12±0,01	108,3±0,5
MMC 0,100 µg/ml	95,50*±6,36	1,99±0,01	38,16±0,32
Concentração NM-403 (µg/ml)	CBMN/1000 CB	CBPI	RI(%)
0	12,50±3,54	1,95±0,06	100±0,00
2,5	9,50±2,12	1,93±0,11	98,10±11,25
5	10,00±1,41	1,91±0,00	95,54±0,21
15	6,00*±2,83	1,95±0,00	100,36±0,13
45	5,50*±4,95	2,02±0,06	107,66±6,06
60	7,00±1,41	1,94±0,06	99,34±5,96
125	10,50±4,95	1,96±0,01	101,39±1,56
250	10,00±1,41	1,96±0,02	101,33±1,76

MMC 0,100 µg/ml	105*±15,56	1,46±0,16	39,37±7,04
-----------------	------------	-----------	------------

0- Controlo negativo; MMC –mitomicina C (controlo positivo); DP –desvio padrão*
 Significativamente diferente do controlo (P<0,05, teste exato de Fisher); **Significativamente
 diferente do controlo (P<0,05, teste de Mann-Whitney).

Segue-se a Tabela A3.3, correspondente ao ensaio do cometa em células A549 expostas a TiO₂ ou NCTs.

TABELA A3.3. Percentagem de DNA na cauda e momento da cauda olive (OTM) em células A549 expostas a NMs durante 3 ou 24h.

Concentração de NM-102 (µg/ml)	3h de exposição (média ± DP)		24h de exposição (média ± DP)	
	DNA na cauda (%)	OTM	DNA na cauda (%)	OTM
0	1,40±0,16	0,27±0,04	2,34±0,97	0,39±0,16
5	1,74±0,43	0,29±0,05	1,86±0,05	0,3±0
16	2,46±1,10	0,28±0,07	2,18±1,03	0,36±0,23
32	4,48±0,90	0,48±0,06	3,11±0,69	0,44±0,17
64	5,85±0,57	0,36±0,04	4,84±0,38	0,69±0,03
128	9,13±0,57	0,93±0,11	7,18±3,16	0,82±0,35
256	9,6±2,88	0,72±0,31	6,54±1,79	0,9±0,14
H ₂ O ₂ 10 mM	47,5±0,70	13,7±0,38	12,43±2,8	2,07±0,55
Concentração de NM-402 (µg/ml)	3h de exposição (média ± DP)		24h de exposição (média ± DP)	
	DNA na cauda (%)	OTM	DNA na cauda (%)	OTM
0	2,48±0,22	0,25±0,09	1,06±0,08	0,13±0,02
5	2,65±0,49	0,4±0,24	1,51±0,44	0,26±0,01
16	1,74±0,63	0,25±0,09	1,8±0,31	0,24±0,04
32	2,05±0,04	0,34±0,09	1,72±0,32	0,29±0
64	2,64±0,02	0,38±0,07	2,98±1,76	0,38±0,2
128	3,97±2,85	0,69±0,59	2,14±0,21	0,28±0,04
256	2,08±0,94	0,24±0,1	2,17±0,9	0,27±0,14
Concentração de NM-403 (µg/ml)	3h de exposição (média ± DP)		24h de exposição (média ± DP)	
	DNA na cauda (%)	OTM	DNA na cauda (%)	OTM
0	2,48±0,22	0,25±0,09	1,06±0,08	0,13±0,02
5	1,25±0,09	0,21±0,01	1,87±0,92	0,29±0,08
16	2,86±0,23	0,42±0,03	2,47±0,15	0,32±0,04
32	3,75±1,41	0,71±0,3	3,12±1,17	0,42±0,15
64	4,25±0,53	0,64±0,21	2,29±0,15	0,36±0,07
128	3,52±0,87	0,5±0,27	5,03±0,45	0,74±0,02
256	5,01±0,53	0,71±0,04	4,59±0,79	0,69±0,01
H ₂ O ₂ 10 mM	74,38±1,29	29,67±1,28	-	-

0- Controlo negativo; DP- desvio –padrão; H₂O₂ –peróxido de hidrogénio (controlo positivo).

APÊNDICE IV. TABELAS DE RESULTADOS DOS ENSAIOS EM CÉLULAS EXPOSTAS A ÓXIDO DE ZINCO

Na Tabela A4.1. a A4.2 descrevem-se os resultados dos ensaios de viabilidade em celular após exposição a NM-110.

TABELA A4.1. Resultados do ensaio de viabilidade por incorporação do azul de tripano em células BEAS-2B expostas 24h a NM-110.

Concentração de NM-110 (µg/ml)	Viabilidade Celular (%) (média ± DP)
0	100±0
1,5	97,66±11,55
4,5	95,56±31,72
6	101,76±33,19
7,5	9,76*±4,62

0- Controlo negativo; DP- desvio padrão.

TABELA A4.2. Resultados do ensaio de viabilidade por ensaio do vermelho neutro em células A549 expostas a NM-110 por 24h.

Concentração de NM-110 (µg/ml)	Viabilidade Celular (%) (média±DP)
0	100±0
8	98,97±2,47
16	97,9±10,39
20	103,97±2,36
32	76,97±5,17
40	63,46±2,36
64	53,22±3,93
128	37,05±3,43
200	16,24±0,28
256	12,91±0,62
MMC 0.3 mM	93,76±2,41

0- Controlo negativo; MMC –mitomicina C (controlo positivo). DP- desvio padrão.

Adicionalmente, o ensaio clonogénico em A549 expostas a NM-110 apresenta-se na Tabela seguinte:

TABELA A4.3. Ensaio clonogénico para determinação de viabilidade celular em A549.

Concentração (µg/ml)	Eficiência de Plaques (média±DP)	Fração Sobrevivente (média±DP)
0	62,67±6,6	1,00±0,07
NM-110, 20 µg/ml	21,17±6,89	0,4*±0,38

*Significativamente diferente do controlo, $p=0,012$ (teste t-Student). DP- desvio padrão.

A interferência do NM-110 com a proliferação celular em linfócitos humanos, através do índice de bloqueio da citocinese (CBPI) e do índice replicativo (RI) é apresentada na Tabela A4.4 juntamente com a frequência de micronúcleos.

TABELA A4.4. Resultados do ensaio do micronúcleo e do cometa células expostas a NM-110.

Linfócitos		Ensaio do micronúcleo (média±DP)		
Concentração (µg/ml)	CBMN/1000 CB	CBPI	RI	
0	6,90±2,42	2,21±0,18	100	
16	7,50±0	2,11±0	-	
32	7,57±3,63	1,83**±0,37	71,07±22,75	
50	6	1,81	-	
64	11,41*±4,15	1,75**±0,22	60,5**±16,77	
128	9,35±4,92	1,61**±0,22	37,18**±22,94	
250	1,25*±1,77	1,30**±0,25	32,09±40,55	

BEAS-2B		Ensaio do micronúcleo (média±DP)			Ensaio do cometa (média±DP)
Concentração (µg/ml)	CBMN/1000 CB	CBPI	RI	DNA na cauda (%)	
0	12,25±2,22	2,23±0,07	100	1,77±1,73	
1,5	12,5±1,73	2,24±0,03	96,9±2,58	1,84±1,18	
4,5	10,5±2,38	2,22±0,03	95,8**±2,4	1,58±1,32	
7,5	NA	1,10**±0,03	7,94**±2,07	45,96**±16,03	
MMC 0.15 µg/ml	85,25*±15	1,26**±0,07	20,4**±5,33	-	

A549		Ensaio do micronúcleo (média±DP)			Ensaio do cometa (média±DP)
Concentração (µg/ml)	CBMN/1000 CB	CBPI	RI	DNA na cauda (%)	
0	12,25±6,55	1,99±0,08	100±0	2,34±0,97	
20	32,25*±26,74	1,73±0,32	72,33±29,2	56,39**±0,36	

0- Controlo negativo; DP- desvio padrão.

*Significativamente superior aos controlos negativos ($p < 0,05$; teste exato de Fisher).

**Significativamente superior aos controlos negativos ($p < 0,05$; teste Mann-Whitney).

APÊNDICE V. TABELAS DE RESULTADOS DO ENSAIO DO COMETA MODIFICADO COM FPG

Os resultados do ensaio do cometa modificado com a utilização de enzima FPG em células BEAS-2B, representam-se nas tabelas seguintes.

TABELA A5.1. Resultados do ensaio do cometa modificado: DNA na cauda, momento da cauda olive (OTM) e lesões oxidativas em células BEAS-2B expostas a NMs em células expostas durante 24h a NMs.

24h de exposição	NM-102 (média±DP)			NM-402 (média±DP)		
Concentração (µg/ml)	DNA na cauda (%)	OTM	Lesões oxidativas	DNA na cauda (%)	OTM	Lesões oxidativas
0	4,08±0,84	0,48±0,11	1,54±1,63	4,08±0,84	0,48±0,11	1,54±1,63
64	3,93±0,47	0,47±0,04	1,13±0,57	5,45±1,09	0,64±0,13	2,35±0,87
128	4,74±0,67	0,61±0,1	2,39±1,27	4,61±2,44	0,57±0,29	0,5±2,02
256	3,88±1,66	0,48±0,22	1,42±2,43	5,04±1,15	0,61±0,14	1,97±1,23
H ₂ O ₂ 10 mM	71,39±9,98	22,07±5,72	14,68*±8,26	71,39±9,98	22,07±5,72	14,68*±8,26

24h de exposição	NM-110 (média±DP)		
Concentração (µg/ml)	DNA na cauda (%)	OTM	Lesões oxidativas
0	4,08±0,84	0,48±0,11	1,54±1,63
1,5	4,12±1,09	0,52±0,11	2,25±2,08
4,5	3,48±0,67	0,43±0,14	0,97±1,74
7,5	7,37±5,33	1,12±0,88	4,88±4,28
H ₂ O ₂ 10 mM	71,39±9,98	22,07±5,72	14,68*±8,26

0- Controlo negativo; H₂O₂ –peróxido de hidrogénio (controlo positivo). * Significativamente diferente do controlo ((P<0,05, teste Mann-Whitney).

Apresentam-se de seguida os resultados do ensaio do cometa modificado com FPG em células A549, expostas por 3h e 24h aos NMs.

TABELA A5.2. Resultados do ensaio do cometa modificado: DNA na cauda, momento da cauda olive (OTM)) e lesões oxidativas em células A549 expostas a NMs em células expostas durante 3 ou 24h a NMs.

NM102		3h de exposição			24h de exposição		
Concentração (µg/ml)	DNA na cauda (%)	OTM	Lesões oxidativas	DNA na cauda (%)	OTM	Lesões oxidativas	
0	1,92±0,74	0,28±0,07	0,53±0,89	2,74±0,26	0,38±0,12	0,4±0,71	
5	2,59±1,48	0,37±0,21	0,85±1,05	4,66±0,34	0,73±0,07	0,13±0,74	
16	2,62±1,3	0,32±0,24	0,17±2,40	2,05±0,3	0,34±0,1	1,55±2,71	
32	3,73±2,49	0,43±0,2	-0,75±1,59	4,66±2,02	0,67±0,22	2,32±0,62	
64	8,67±3,99	0,97±0,36	2,82±4,55	7,16±1	1,01±0,21	1,89±2,67	
128	11,46±1,7	1,14±0,27	2,33±2,27	5,29±0,49	0,75±0,05	3,11±1,66	
256	11,43±0,21	1,14±0,14	1,83±3,09	3,43±0,13	0,46±0,04	2,62±2,02	
H ₂ O ₂ 10 mM	59,67*±6,07	19,48*±2,82	12,17*±7,16	21,9±*0,2	3,89*±0,05		
NM-402		3h de exposição			24h de exposição		
Concentração (µg/ml)	DNA na cauda (%)	OTM	Lesões oxidativas	DNA na cauda (%)	OTM	Lesões oxidativas	
0	2,76±1,42	0,49±0,24	0,27±1,64	3,49±1,14	0,45±0,12	2,43±1,22	
5	2,79±1,59	0,44±0,16	0,14±2,08	4,13±0,21	0,59±0,01	2,62±0,65	
16	3,12±0,79	0,47±0,13	1,39±1,42	2,87±1,02	0,34±0,13	1,07±0,71	
32	2,89±0,73	0,43±0,04	0,84±0,77	3,6±0,6	0,53±0,07	1,88±0,92	
64	4,11±0,79	0,63±0,18	1,48±0,81	-	-	-	
128	5,27±1,28	0,79±0,3	1,29±4,13	4,05±0,22	0,57±0,02	1,9±0,015	
256	3,55±0,65	0,46±0,09	1,47±1,59	4,4±0,31	0,59±0,05	2,23±0,60	
H ₂ O ₂ 10 mM	74,38*±1,29	29,67*±1,28	12,17*±7,16	71,65*±0,44	25,34*±0,92		
NM-403		3h de exposição			24h de exposição		
Concentração (µg/ml)	DNA na cauda (%)	OTM	Lesões oxidativas	DNA na cauda (%)	OTM	Lesões oxidativas	
0	2,76±1,42	0,49±0,24	0,27±1,64	3,49±1,14	0,45±0,12	2,43±1,21	
5	4,91±1,47	0,62±0,18	3,65±1,38	3,67±0,68	0,52±0,08	1,79±1,59	
16	4,05±2,01	0,57±0,38	1,19±2,24	2,72±0,44	0,39±0,07	0,26±0,28	
32	3,65±0,27	0,57±0,04	-0,1±1,14	3,02±0,2	0,45±0,04	-0,1±1,37	
64	4,93±1,59	0,77±0,14	0,68±2,11	4,17±1,96	0,53±0,17	1,88±2,11	
128	6,6±1,46	0,79±0,21	3,08±2,32	6,06±2,73	0,86±0,29	1,03±3,18	
256	6,28±0,19	0,9±0,11	1,27±0,71	5,06±2,7	0,59±0,28	0,47±1,916	
H ₂ O ₂ 10 mM	74,38*±1,29	29,67*±1,28	12,17*±7,16	71,65*±0,44	25,34*±0,92	74,38*±1,29	
NM-110		3h de exposição			24h de exposição		
Concentração (µg/ml)	DNA na cauda (%)	OTM	Lesões oxidativas	DNA na cauda (%)	OTM	Lesões oxidativas	
0	2,34±1,04	0,49±0,24	0,40±1,09	3,12±0,80	0,46±0,24	1,42±1,43	
20	3,92±2,84	0,30±0,011	1,92±3,71	3,84±1,05	0,73±0,29	1,73±1,47	

0- Controlo negativo; H₂O₂ –peróxido de hidrogénio (controlo positivo). * Significativamente diferente do controlo ((P<0,05, teste Mann-Whitney).

De seguida apresentam-se as tabelas relativas aos resultados do ensaio do micronúcleo em células expostas a NM-110.

TABELA A5.3. Frequências de células binucleadas (CB) micronucleadas (CBMN), índice de bloqueio da citocinese (CBPI), índice replicativo (RI) e DNA na cauda em células expostas a NM-110.

Linfócitos		Ensaio do micronúcleo (média±DP)		
Concentração		CBMN/1000 CB	CBPI	RI
(µg/ml)				
0		6,90±2,42	2,21±0,18	100,00
16		7,50±0	2,11±0	-
32		7,57±3,63	1,83**±0,37	71,07±22,75
50		6,00	1,81	-
64		11,41*±4,15	1,75**±0,22	60,5**±16,77
128		9,35±4,92	1,61**±0,22	37,18**±22,94
250		1,25*±1,77	1,30**±0,25	32,09±40,55

BEAS-2B		Ensaio do micronúcleo (média±DP)			Ensaio do cometa (média±DP)
Concentração		CBMN/1000 CB	CBPI	RI	DNA na cauda (%)
(µg/ml)					
0		12,25±2,22	2,23±0,07	100,00	1,77±1,73
1,5		12,5±1,73	2,24±0,03	96,9±2,58	1,84±1,18
4,5		10,5±2,38	2,22±0,03	95,8**±2,4	1,58±1,32
7,5		NA	1,10**±0,03	7,94**±2,07	45,96**±16,03
MMC 0.15 µg/ml		85,25*±15	1,26**±0,07	20,4**±5,33	-

A549		Ensaio do micronúcleo (média±DP)			Ensaio do cometa (média±DP)
Concentração		CBMN/1000 CB	CBPI	RI	DNA na cauda (%)
(µg/ml)					
0		12,25±6,55	1,99±0,08	100±0	2,34±0,97
20		32,25*±26,74	1,73±0,32	72,33±29,2	56,39**±0,36

0- Controlo negativo; MMC –mitomicina C (controlo positivo); DP- desvio padrão. NA- não analisável; * Significativamente diferente do controlo (P<0,05, teste exacto de Fisher) ** Significativamente diferente do controlo (P<0,05, teste Anova com post-hocs).

APÊNDICE VI. TABELAS DA EXPOSIÇÃO DE RATINHOS A NM-102

A Tabela A6.1. apresenta a evolução do peso corporal dos ratinhos expostos a NM-102, durante o período de expressão de mutações, utilizado como indicador de toxicidade.

TABELA A6.1. Registo dos pesos dos ratinhos após exposição aos NMs e ENU.

Dose NM (mg/kg)	Peso no dia 1 (g)	Peso no dia 10 (g)	Peso no dia 19 (g)	Peso no dia 30 (g)	Variação (g)	Média da Variação de Peso± DP
0	24,0	23,0	24,6	25,5	1,5	1,84 ± 0,66
0	25,7	25,7	27,4	28,3	2,6	
0	20,2	20,7	22,2	22,6	2,4	
0	23,9	24,6	25,7	25,6	1,7	
0	24,0	23,1	22,4	25	1,0	
10	21,1	21,7	24,0	22,5	1,4	1,92±0,61
10	23,3	25,3	25,8	26,3	3,0	
10	22,5	23,0	23,6	24,5	2,0	
10	24,9	25,1	26,3	27,0	2,1	
10	24,3	24,2	24,8	25,9	1,6	
10	23,3	23,4	24,0	24,7	1,4	
15	23,9	25,2	25,4	25,3	1,4	2,00±0,62
15	24,4	25,0	25,8	27,2	2,8	
15	21,4	21,5	21,8	22,8	1,4	
15	20,4	22,0	21,6	22,4	2,0	
15	23,5	23,9	25,0	25,9	2,4	
ENU	21,3	22,5	22,9	23,4	2,1	2,06±1,25
ENU	21,6	22,3	23,0	23,8	2,2	
ENU	24,8	26,0	26,0	26,5	1,7	
ENU	20,4	---	19,3	20,8	0,4	
ENU	20,4	22,8	24,3	24,3	3,9	

0- Controlo negativo; ENU –etilnitrosureia (controlo positivo). DP- desvio padrão.

Tabela A6.2. Resultados do ensaio do micronúcleo em reticulócitos (MNRET) de sangue periférico de ratinhos, 42h após a última injeção de NM-102.

Dose (mg/kg)	n	MNRET/1000 Ret	RET (%)
		Média ±DP	Média ±DP
0	5	6.10 ± 1.98	7.54 ± 1.91
NM-102, 10 mg/kg	5	3.90 ± 1.85	8.53 ± 2.82
NM-102, 15 mg/kg	6	4.42 ± 1.69	7.43 ± 1.45
ENU 120, mg/kg	5	11.48* ± 4.06	1.95 ± 1.01

n- número de ratinhos por grupo de tratamento; MNRET – reticulócitos micronucleados; Ret-reticulocitos; DP- desvio padrão.* Significativamente diferente do controlo neagtivo ($p < 0,001$, teste χ^2).